

Aus dem Lehrstuhl Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Die Auswirkung von Matrixmetalloproteasen-Inhibitoren
auf die Interaktion von Bakterien mit intestinalen Epithelzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Lampe, geb. Rinner

Aus dem Lehrstuhl Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Die Auswirkung von Matrixmetalloproteasen-Inhibitoren
auf die Interaktion von Bakterien mit intestinalen Epithelzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Lampe, geb. Rinner

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Martina Müller-Schilling, MHBA

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Brunner

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Physiologie der Leber – Aufbau und Aufgaben	6
1.2	Pathophysiologie der Leber – Leberzirrhose	6
1.3	Der menschliche Darm und die Darm-Gefäß-Barriere	8
1.4	Das Mikrobiom	10
1.5	Die Darm-Leber-Achse.....	10
1.6	Das intestinale Immunsystem	11
1.7	Zell-Zell-Kontakte	12
1.8	Matrixmetalloproteasen	13
1.9	MMP-Inhibitoren.....	15
1.10	Spontan bakterielle Peritonitis	15
1.11	Ziele dieser Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte und Laborbedarf.....	19
2.1.2	Software	21
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Fertigkits	21
2.1.4	Antikörper.....	24
2.1.5	Inhibitoren	24
2.1.6	qRT-PCR Primer	25
2.2	Zellkultur.....	25
2.3	Bakterien	26
2.3.1	Bakterienkulturen	26
2.3.2	Übernachtskultur.....	27
2.3.3	Messung der optischen Dichte	27
2.4	<i>In vitro</i> Modell: Bakterielle Ko-Kultur	27

2.5	Molekularbiologische Analysen	28
2.5.1	Kristallviolett-Färbung zur Darstellung der Zellkonfluenz der Ko-Kultur	28
2.5.2	Analysen auf RNA-Ebene	28
2.5.3	Analysen auf Protein-Ebene.....	29
2.5.4	Gelatinzymographie	30
2.5.5	Durchflusszytometrische Untersuchung des Bakterien- induzierten Zelltods	31
2.6	Analysen der bakteriellen Aktivität.....	32
2.6.1	Azocasein Assay	32
2.6.2	FITC-Casein Assay	32
2.7	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Destabilisierung von epithelialen Zell-Zell-Kontakten durch <i>E. coli</i> O6:Hnt	34
3.2	Stabilisierung von E-Cadherin und Occludin durch MMP-Inhibitoren	37
3.3	Bakterielle Proteaseaktivität als Zielsubstrat der MMP-Inhibitoren.....	40
3.4	Destabilisation der intestinalen Darmbarriere durch klinisch relevante SBP-Bakterien.....	42
4	Diskussion.....	50
4.1	SBP als schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose	50
4.2	Bakterielle Translokation über die destabilisierte intestinale Barriere.....	50
4.3	Degradation von E-Cadherin durch eine bisher unbekannte bakterielle Proteaseaktivität mit Folge der Destabilisierung der epithelialen Integrität	51
4.4	Die Suche nach der Protease	54
4.5	Alternative Mechanismen für die Degradation von E-Cadherin.....	54
4.6	Proteaseinhibition als Therapiestrategie bei Leberzirrhose und SBP	55
5	Zusammenfassung.....	57

6	Abkürzungsverzeichnis	58
7	Anhang.....	59
8	Literatur.....	60
9	Selbstständigkeitserklärung	70
10	Danksagung.....	71

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Leber – Aufbau und Aufgaben

Die Leber erfüllt viele lebenswichtige Aufgaben im menschlichen Körper. So produziert sie Plasmaproteine wie Albumin und Gerinnungsfaktoren, ist an der Regulation des Immunsystems sowie am Fettstoffwechsel beteiligt und sorgt für die Entgiftung des Körpers (1).

Aufgebaut ist die Leber in 2 große sowie 2 kleine Leberlappen oder in 8 Lebersegmente, welche durch ihre segmentale Durchblutung unterschieden werden können (2,3). Dabei gelangt sauerstoffreiches arterielles Blut über die *Arteria hepatica* und nährstoffreiches Blut über die Pfortader direkt in die Leber, wo sich diese Gefäße zunehmend verzweigen bevor sich über Sinusoide und Zentralvenenäste Lebervenen bilden, welche über die *Vena cava inferior* zum Herzen führen (3). Somit besteht über die Pfortader eine direkte Verbindung vom Darm zur Leber, was eine direkte Interaktion beider Organe miteinander im Sinne der Darm-Leber-Achse ermöglicht (4).

Histologisch besteht das Lebergewebe überwiegend aus Hepatozyten und Cholangiozyten sowie deren Vorläuferzellen, außerdem finden sich Endothelzellen, Sternzellen, Kupffer-Zellen und Lymphozyten, die gemeinsam zur Erfüllung der Funktionen der Leber beitragen (1,3).

1.2 Pathophysiologie der Leber – Leberzirrhose

Aus den Aufgaben der Leber lässt sich ableiten, welche Konsequenzen durch ihre Insuffizienz bei Leberzirrhose entstehen (Abbildung 1).

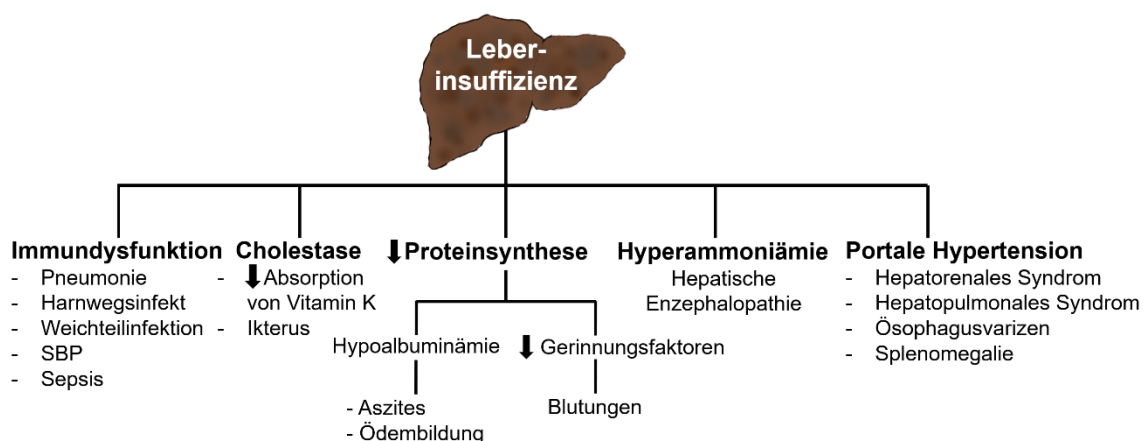


Abbildung 1: Auswirkungen der Leberinsuffizienz bei Leberzirrhose. Interaktionen unter den Folgen der Leberzirrhose bedingen lebensbedrohliche Veränderungen im menschlichen Körper (adaptiert nach (2,5–11)).

Einleitung

So bewirkt eine gleichzeitige Immundefizienz durch $CD4^+$ -T-Zell-Mangel und überschießende Immunantwort durch sezernierte Zytokine eine Dysregulation, die sich in Form vieler Erkrankungen wie Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Weichteilinfektionen, spontan bakterieller Peritonitis (SBP) und Sepsis manifestieren kann (5). Dieser Immundefekt entsteht durch einen Mangel an $CD4^+$ -T-Zellen sowie deren Funktionsverlust. Zusätzlich trägt eine eingeschränkte Fähigkeit der Leber, gegen Antigene vorzugehen, und eine verstärkte Leberfibrose zur Schwächung des Immunsystems bei. Als Folge dieser Prozesse wird eine erhöhte Menge an Zytokinen freigesetzt, was einen „Circulus vitiosus“ in Gang setzt. Ein wichtiger Bestandteil dieses Kreislaufs ist die sogenannte „Leaky Gut“-Situation, bei der eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmschleimhaut es Bakterien und anderen schädlichen Substanzen ermöglicht, in den Blutkreislauf zu gelangen und so die Immunantwort weiter zu beeinträchtigen (6).

Eine durch mikro- und makroskopischen Umbau des Lebergewebes resultierende Cholestase bewirkt nicht nur das Entstehen des für Leberversagen charakteristischen Ikterus, sondern führt über Malabsorption von Vitamin K zur Reduktion der davon abhängigen Produktion der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X (2).

Die Proteinsynthese ist bei einer zirrhotisch veränderten Leber reduziert. Die daraus resultierende Hypoalbuminämie führt zu Ödembildung und gemeinsam mit portaler Hypertension und splanchnischer Vasodilatation zu Aszites (7). Durch eine veränderte Produktion von pro- und antikoagulatorischen Faktoren befinden sich Patienten mit chronischen Lebererkrankungen in einem Zustand der Instabilität bezüglich der Gerinnung, was sich sowohl in einer Neigung zu Blutungen als auch zu Thrombosen widerspiegelt (8).

Hyperammoniämie durch mangelnden Abbau des Ammoniaks aus dem Blut führt zur hepatischen Enzephalopathie und Hirnödemen, da die Ansammlung von Ammoniak toxisch auf das zentrale Nervensystem wirkt und die Blut-Hirn-Schranke schädigt (9).

Eine portale Hypertension entsteht unter anderem durch einen erhöhten intrahepatischen Widerstand der zirrhotisch veränderten Leber und kann zum hepato-renal und -pulmonalen Syndrom (10) sowie zur Splenomegalie führen. Außerdem trägt sie zur Entstehung von Varizen, beispielsweise in Form der *Caput medusae* oder Öso-

Einleitung

phagusvarizen bei. Letztere können insbesondere durch die reduzierte Proteinsyntheseleistung der zirrhotisch veränderten Leber, die geringe Aufnahme von Vitamin K und den hohen intravasalen Druck lebensbedrohlich stark bluten (2,11).

Der menschliche Körper ist in der Lage, über einen längeren Zeitraum hinweg den Leberschaden zu kompensieren. Bei Auftreten von Aszites, einer gastrointestinalen Blutung, hepatischen Enzephalopathie oder Ikterus spricht man von dekompenzierter Leberzirrhose (12). Ein Akut-auf-chronisches Leberversagen auf dem Boden einer Leberzirrhose geht mit einer hohen Mortalität von 33–50% einher (13).

Mit mehr als 1 Million Toten pro Jahr und steigender Tendenz ist die Leberzirrhose eine weltweit stark verbreitete Erkrankung (7,14,15), die durch unterschiedliche Manifestationsarten oft erst in späteren Stadien erkannt wird.

Die Leberzirrhose hat verschiedene Ätiologien. Die häufigste Form in westlichen Ländern ist die äthyltoxische Leberzirrhose, gefolgt von Virushepatitiden, die vor allem in Asien einen Großteil der Leberzirrhosen zur Folge haben (16). Auch die metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (*metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*; MASLD) kann über die metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatohepatitis (*metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*; MASH) zunehmend die Entwicklung der Leberzirrhose bedingen. Hierbei führt die zunehmende Fibrosierung der Leber über einen längeren Zeitraum hinweg zur Leberzirrhose (17) und kann letztlich zur Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms beitragen (18).

1.3 Der menschliche Darm und die Darm-Gefäß-Barriere

Der menschliche Darm wird in den 5 – 7 m langen Dünndarm und den Dickdarm, der etwa 1,5 m umfasst, unterteilt (19). Funktionen des Darmes schließen Nahrungsaufschluss, Resorption von Nährstoffen und Rückresorption von Wasser ein. Zudem ist im Darm ein wesentlicher Anteil des Immunsystems lokalisiert (20).

Der grundsätzliche Aufbau des Darmes in Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa ist in allen Abschnitten ähnlich, unterscheidet sich jedoch in den einzelnen Darmabschnitten in spezifischen Details (21). Im Folgenden wird auf den Dickdarm eingegangen.

Einleitung

Krypten tragen zur Vergrößerung der Darmoberfläche bei (22). Luminal gelegen finden sich dicht aneinandergereihte Kolonozyten, die den basal gelegenen Stammzellen entstammen und Richtung apikal migrieren (23). Die Kolonozyten bilden eine einschichtige Lage und sind über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, sodass sie eine epitheliale Barriere bilden. Diese Schicht stellt eine semipermeable Membran dar, die eine wichtige Rolle für die intestinale Homöostase spielt (24). Mit einem Zell-Turnover von 4 – 5 Tagen ist das intestinale Epithel das sich am schnellsten erneuernde Gewebe des Menschen (25). Die Stammzellen sind auch der Ursprung der Becherzellen und neuroendokrinen Zellen, die an der Erneuerung der Mukusschicht beteiligt sind (26). Diese Mukusschicht wird durch die Vernetzung unter anderem von MUC2-Proteinen durch die Becherzellen gebildet und dient nicht nur dem erleichterten Gleiten des Darminhaltes (22), sondern auch dem Schutz vor Darmpathogenen. Anders als im Dünndarm ist die Mukusschicht im Dickdarm zweischichtig, sie besteht aus einer inneren, sterilen und einer äußeren Schicht, in der sich Bakterien befinden (27) (Abbildung 2).

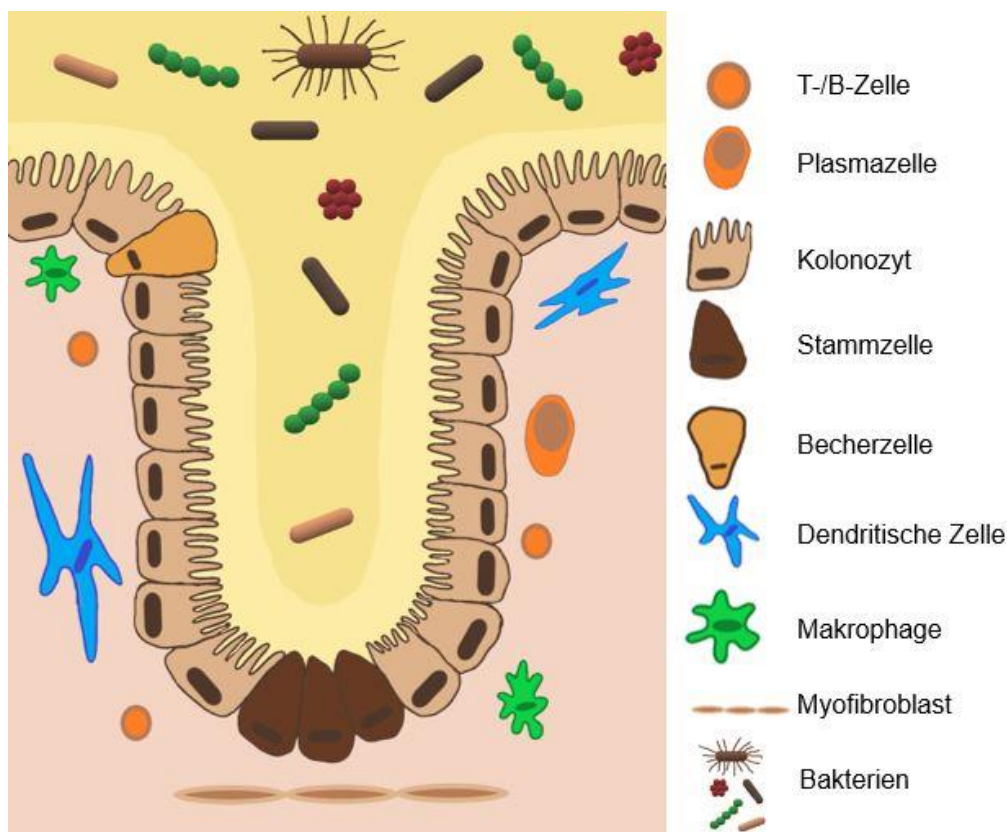


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Epithels im menschlichen Dickdarm. Das einschichtige Epithel besteht aus Kolonozyten, Becherzellen, die an der Produktion des 2-schichtigen Mucus beteiligt sind, und basal gelegenen Stammzellen. Dendritische Zellen, Makrophagen, Plasmazellen sowie B- und T-Zellen, sind Bestandteile des intestinalen Immunsystems. Bakterien befinden sich in der äußeren Mukusschicht (adaptiert nach (19,26,32,81,82)).

Einleitung

Neben dem Mukus und der Epithelzellschicht stellt auch die Darm-Gefäß-Barriere (*gut-vascular-barrier*; GVB) einen Teil der intestinalen Barriere dar (28). Die GVB besteht aus Endothelzellen, Perizyten sowie enterischen Gliazellen und bildet die letzte Hürde, die eine Substanz überwinden muss, um vom Darm in die systemische Zirkulation zu gelangen (28,29).

1.4 Das Mikrobiom

Das Mikrobiom im menschlichen Darm beinhaltet etwa 10^{14} Mikroorganismen, die neben Eukaryoten, Archaeen und Viren auch eine Vielzahl von Bakterien umfassen (30). Diese bilden eine transiente und eine endogene Flora (31). Durch beständige Bakterien wird einer Besiedelung durch potentiell schädliche Keime entgegengewirkt (31). Dies geschieht nicht nur durch Konkurrenz um Darmsurface und Ressourcen, sondern auch durch das Absondern von antimikrobiellen Substanzen (30). Auch tragen die Darmbakterien wesentlich zur Aufnahme verschiedener Vitamine und Metabolisierung von Nährstoffen bei, sodass der menschliche Organismus durchaus von der Anwesenheit der Bakterien profitiert (20,32,33).

Die Zusammensetzung des Mikrobioms variiert je nach Lokalisation im Gastrointestinaltrakt. Während im Magen vor allem *Helicobacter*-Spezies vorkommen und im Dünndarm überwiegend Streptokokken, Laktobazillen und Enterokokken nachweisbar sind, weist der Dickdarm eine große und interindividuell unterschiedliche Vielfalt an Bakterienspezies auf (30).

Bei Patienten mit Leberzirrhose kommt es zu Veränderungen in der bakteriellen Besiedlung des Darms (34). Eine Reduktion nützlicher Bakterien geht mit einer vermehrten Besiedlung durch Enterokokken, Enterobakterien und Staphylokokken einher. Zudem kann das Wachstum von Dickdarmbakterien im Dünndarm zu einer bakteriellen Fehlbesiedlung führen (35).

1.5 Die Darm-Leber-Achse

Über die Pfortader erfolgt ein Austausch zwischen Darm und Leber (4). Nährstoffe werden aus dem Darm zur Leber transportiert, während Gallensäuren sowie Antikörper aus der Leber zum Darm geleitet werden. Diese direkte Verbindung ermöglicht einen schnellen und effektiven Weitertransport verschiedenster Stoffe, stellt jedoch auch einen empfindlichen Angriffspunkt für eindringende Erreger dar. So darf das Mik-

robiom des Darmes nicht ohne weiteres über die Pfortader in den menschlichen Blutkreislauf gelangen. Um dies zu verhindern, weist der menschliche Körper neben der GVB und der Mukusschicht weitere regulatorische Systeme wie das intestinale Immunsystem und Zell-Zell-Kontakte innerhalb der epithelialen Barriere auf, auf die im Folgenden näher eingegangen wird (4,36).

1.6 Das intestinale Immunsystem

Das intestinale Immunsystem dient unter anderem dem Zweck, über den Darm eindringende Erreger zu identifizieren und abzuwehren. Es variiert in seiner Zusammensetzung in Abhängigkeit vom jeweiligen Darmabschnitt. Über den gesamten Darm hinweg besteht es aus Epithelzellen, die nicht nur eine physikalische Barriere darstellen, sondern auch auf chemischem Weg über die Sezernierung von beispielsweise proinflammatorischen Zytokinen auf effektive Weise gegen Erreger vorgehen, sowie aus Phagozyten und Lymphozyten. Diese produzieren als Abwehr gegen eindringende Erreger reaktive Sauerstoffspezies (23,33). Im Dünndarm finden sich basal gelegen zahlreiche Paneth-Zellen, welche antimikrobielle Peptide wie Defensine und Lysozym sezernieren, im Dickdarm hingegen nimmt die Zahl der Becherzellen zu, sodass es gerade dort zur Zunahme und zu der bereits beschriebenen Zweischichtung der Mukusschicht kommt (19). Auch das Darm-assoziierte Lymphgewebe unterscheidet sich in seinem Aufbau zwischen Dün- und Dickdarm. Während sich oral vermehrt Peyer-Plaques befinden, welche Lymphfollikel aus B-Zellen sowie T-Zell-Bereiche beinhalten und die über die sie umgebenden M-Zellen Bestandteile von eindringenden Erregern an dendritische Zellen weiterleiten, wird diese wichtige Aufgabe des Immunsystems im Dickdarm von *caecal* und *colonic patches* übernommen, in denen zudem Immunglobulin A produziert wird (19).

Auf diese verschiedenen Wege werden Bakterien am Eindringen gehindert oder durch Zellen des intestinalen Immunsystems sofort eliminiert (37). Aufgrund der Verbindung zwischen Darm und Leber gelangen trotzdem bakterielle Bestandteile über den Darm, das Darm-assoziierte Lymphgewebe und mesenteriale Lymphknoten zur Leber (37,38).

Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) sind bakterielle Produkte, die von Abwehrzellen des Körpers über Muster-

erkennungszeporen wie den Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) erkannt werden und Entzündungsreaktionen auslösen können (36). LPS befinden sich auf der Außenseite gramnegativer Bakterien (39). Bei Veränderungen der Zusammensetzung des Mikrobioms kann es somit auch zu Veränderungen der detektierbaren Menge an LPS kommen. So kann auf der einen Seite beispielsweise die Gabe des Antibiotikums Rifaximin zu einer geringeren Inflammation und geringerem portalen Druck führen (40). Auf der anderen Seite kann eine Aktivierung proinflammatorischer Zytokine über eine Produktion vasoaktiver Peptide eine kardiale Dysfunktion bewirken, welche eine Mangelperfusion von Nieren und Gehirn bedingen kann (37).

1.7 Zell-Zell-Kontakte

Die intestinale Barriere als Grenze zwischen dem menschlichen Organismus und dem Darmlumen steht vor der Aufgabe, einerseits Nährstoffe aufzunehmen und andererseits Erreger abzuwehren (41). Um insbesondere die zweite Funktion erfüllen zu können, müssen die Zellen des Darmepithels nahe und fest genug nebeneinanderliegen, um eine parazelluläre Migration von Bakterien zu verhindern (26). Dies wird durch Zell-Zell-Kontakte gewährleistet (Abbildung 3).

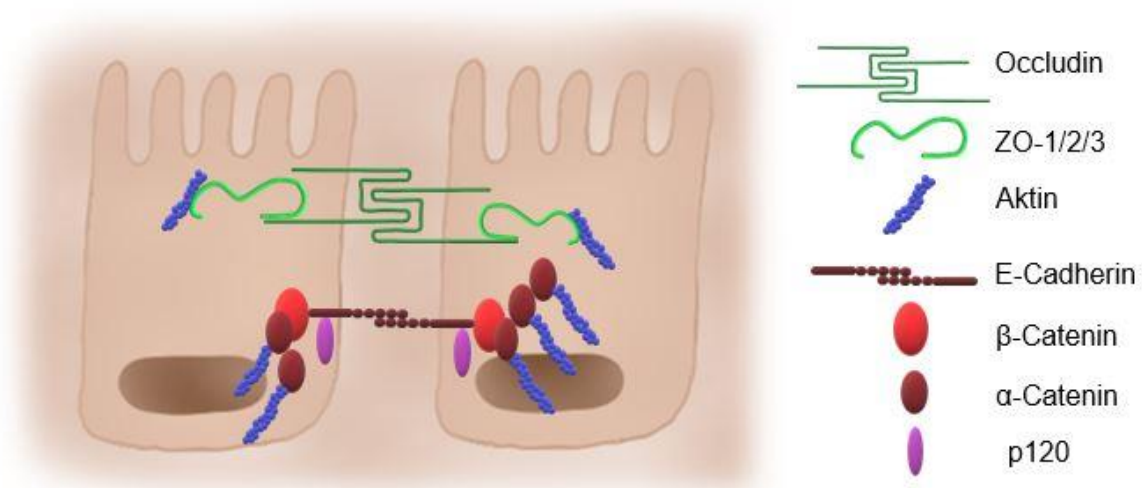


Abbildung 3: Schematische Abbildung von einer *tight-junction* und einer *adherence-junction*: Occludin verbindet über Zonula occludens-Proteine 1, 2 und 3 (ZO-1/2/3) das Zytoskelett aus Aktinfilamenten, während E-Cadherin über die Verbindung mittels α - und β -Cateninen für den Zell-Zell-Zusammenhalt sorgt (adaptiert nach (24,41,43,46,108–112)).

Dabei wird zwischen *tight-junctions* (TJ), *adherence-junctions* (AJ) und Desmosomen unterschieden. Während TJs direkt die parazelluläre Translokation verhindern, sorgen AJs und Desmosomen für direkten Kontakt zwischen den Zellen und unterstützen so

die *TJs* (42). Dabei bilden *TJs* und *AJs* den apikalen junctionalen Komplex, während die Desmosomen weiter basal gelegen sind (43). *TJs* setzen sich aus Occludin, Claudinen, junctionalen Adhäsionsmolekülen (JAMs) sowie Plaque-Proteinen wie Zonula-occludens-1 und Cingulin zusammen. Die *AJs* beinhalten epitheliales Cadherin (E-Cadherin) sowie α - und β -Catenine (44). Desmosomen werden aus Desmoglein, Desmocollin, Desmoplakin und Keratinfilamenten gebildet (44,45).

Occludin ist ein wichtiger Bestandteil der *TJs*. Das Protein ist etwa 65 kDa groß und hat 2 extrazelluläre Schleifen sowie 4 transmembranäre Strukturen (46). Der C-Terminus von Occludin interagiert mit ZO-1 und hat wichtige Signalfunktionen (46). Occludin interagiert mit ZO-1, -2, -3, welche selbst seitständig an Aktinfilamente binden (47). Auch kann Occludin an andere Proteine wie JAM, VAP-33, JEAP und CLMP binden, die ebenfalls zur Stabilität der *TJs* beitragen (47,48). So führt ein Mangel an Occludin zu Instabilität der *TJs* und somit zu erhöhter intestinaler Permeabilität (46).

Die Cadherin Superfamilie stellt die Schlüsselkomponenten der *AJs* dar. Zu dieser gehört unter anderem neben E-Cadherin auch neuronale sowie plazentares Cadherin (N- / P-Cadherin) und ferner p120 Catenin und α - und β -Catenin (25). E-Cadherin, codiert durch das Gen *CDH1* (25), besteht aus 5 extrazellulären Cadherin-Domänen, einer Transmembran-Domäne und einem intrazellulären Bereich. Letzterer ermöglicht die Bindung an β -Catenin, das wiederum über α -Catenin mit Aktin verknüpft ist (49,50). Über die Bildung von Clustern kann die Effektivität der Stabilität der so geschaffenen Verbindung zwischen den Zellen deutlich erhöht werden (50).

1.8 Matrixmetalloproteasen

Der Verlust von *TJ*- und *AJ*-Proteinen führt zur Destabilisierung des Epithels und damit der epithelialen Barriere. Eine Degradation von E-Cadherin und Occludin ist beispielsweise durch Matrixmetalloproteasen (MMPs) beschrieben. Dies geschieht im Rahmen physiologischer Umbauprozesse im Körper wie der Angiogenese oder der Regulation von Barrieren, aber auch bei pathologischen Prozessen wie Krebserkrankungen (46,51,52).

MMPs sind körpereigene Proteasen, die an der Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt sind. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei Wundheilung, Gewebeumbau, Metastasierung und rheumatoider Arthritis (53–56). Bislang sind 23 humane MMPs identifiziert (53).

Einleitung

MMPs werden nach ihrer Struktur und ihren Substraten eingeteilt. So zählen beispielsweise MMP-2 und -9 (Gelatinase A und B) zu den Gelatinasen, da sie dazu in der Lage sind Gelatin zu degradieren. MMP-8 (Kollagenase-2) hingegen ist wie MMP-1 und -13 eine Kollagenase, mit der Spezialisierung unterschiedliche Typen von Kollagen abzubauen (56). Ferner gibt es Matrilysine, Stromelysine, Membran-Typ-MMPs und andere (57). Darüber hinaus bestehen Interaktionen zwischen den verschiedenen MMPs. Bei der MMP-vermittelten Degradierung von Kollagen entsteht Gelatin, welches direkt von *downstream*-MMPs weiter abgebaut werden kann. Auch aktivieren und inhibieren sich MMPs im Zusammenspiel mit den Gewebeinhibitoren von MMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*; TIMPs) gegenseitig (56).

Der grundsätzliche Aufbau der MMPs besteht aus einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne, einer Linker-Region und einer Hemopexin-Domäne (Abbildung 4) (51). Die Pro-Domäne enthält einen Cysteinrest (-SH), über den ein Zink-Ion fixiert wird, wodurch die MMPs inaktiviert bleiben. Erst durch einen sogenannten *cysteine switch* und der folgenden Abspaltung der Pro-Domäne durch autokatalytische Prozesse wird aus dem Zymogen eine funktionsfähige Protease (58). Neben diesem Mechanismus können MMPs auch auf RNA-Ebene sowie durch die bereits erwähnten TIMPs reguliert werden (51). Die katalytische Domäne enthält hoch konservierte Motive, um das Zink-Ion zu binden. Calcium-Ionen dienen der Stabilisierung (51). Ohne die Hemopexin-Domäne wäre eine Katalyse von Kollagen nicht möglich, auch bei der Interaktion sowie Aktivierung unter den MMPs spielt sie eine Schlüsselrolle (56).

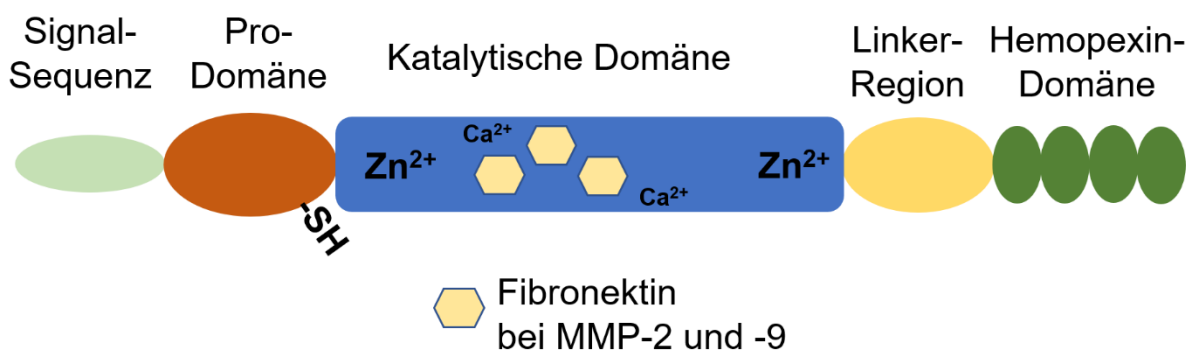


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von MMPs. Die Pro-Domäne enthält eine Cystein-Gruppe, die das Zink-Ion fixiert und so die proMMP inaktiviert. Erst nach deren Prozessierung wird das Zymogen aktiv. Die katalytische Domäne enthält ein Zink-Ion und bei MMP-2 und -9 zusätzlich 3x Typ-II Fibronektin. Die Linker-Region dient der Verbindung zwischen katalytischer Domäne und Hemopexin-Domäne. Calcium-Ionen dienen der Stabilisierung. Die Hemopexin-Domäne unterstützt die katalytische Domäne und sorgt für Interaktion. Einzelne MMPs weichen von dieser Abbildung ab (adaptiert nach (51,53,56,57)).

Einleitung

Einzelne MMPs weichen in ihrem Aufbau etwas vom Grundschema (Abbildung 4) ab (51). Die Gelatinasen beispielsweise weisen in ihrer katalytischen Domäne drei Typ-II-Fibronektin-Motive auf, welche sie zur Degradation von Gelatin befähigen (56).

1.9 MMP-Inhibitoren

Natürliche Inhibitoren der MMPs sind TIMP I – IV und α 2-Makroglobulin, die die Aktivität der MMPs direkt regulieren (56,59). Zudem wurden zahlreiche spezifische Inhibitoren für MMPs entwickelt, die insbesondere als Medikamente bei Krebs und Metastasierung zum Einsatz kommen (58,59). Als einer der ersten Vertreter hierfür ist BB-94 (Batimastat) zu nennen (60). Basierend hierauf wurde BB-2516 (Marimastat) gegen MMP-1, -2, -3, -7, -9 und -12 entwickelt, das anders als BB-94 oral gegeben werden kann, doch aufgrund starker unerwünschter Nebenwirkungen wie Muskelschmerzen und mangelnder Wirksamkeit nicht zugelassen worden ist (58,61). Beide Wirkstoffe sind Breitspektrum-MMP-Inhibitoren, ahmen die Struktur von Kollagen nach und bewirken dadurch eine Chelatierung des Zink-Ions (62,63). Ein Hindernis bei der Therapie mit MMP-Inhibitoren könnte sein, dass einige MMPs Antitargets sein können, so dass eine zusätzliche Reduktion der Wirkung dieser MMPs zu einem schwereren Krankheitsverlauf oder ausgeprägten unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte (64).

Ein wichtiger Schritt ist daher die Entwicklung selektiver Inhibitoren. Bislang für Forschungszwecke, wurden zum Beispiel der selektive MMP-2 und -9-Inhibitor SB-3CT und der MMP-8-Inhibitor I entwickelt. Diese wirken laut Herstellerangaben irreversibel (65,66).

1.10 Spontan bakterielle Peritonitis

Wenn die Leber-Darm-Achse in Folge einer Leberzirrhose in Dysbalance gerät, führt das wechselseitig zu Veränderungen im Mikrobiom des Darmes und zum Fortschreiten der Leberzirrhose. Dies kann beispielsweise über eine verstärkte Produktion von kurzkettigen Fettsäuren geschehen, welche Immunprozesse induzieren können (38). Eine nennenswerte Erkrankung in diesem Zusammenhang ist die spontan bakterielle Peritonitis (SBP).

SBP ist eine gefährliche Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites (67). Definiert wird sie als bakterielle Infektion von Aszites bei Fehlen einer anderen chirurg-

gisch sanierbaren Ursache innerhalb der Bauchhöhle. Die Diagnose wird typischerweise durch die Untersuchung der Peritonealflüssigkeit gestellt, wobei eine positive Kultur sowie eine Zahl an polymorphonukleären Zellen von mehr als 250 / μ l als diagnostisch gelten (67). Eine SBP tritt bei ca. 17 % der Patienten mit Leberzirrhose auf und geht mit einer hohen 1-Jahresmortalität von 30 % einher (68). Klinisch präsentiert sich ein Patient mit SBP mit Fieber, Entwicklung oder Verschlechterung einer hepatischen Enzephalopathie und Bauchschmerzen, wobei eine SBP aber auch symptomfrei verlaufen kann (67).

Die Behandlung eines Patienten mit SBP erfolgt antibiotisch und durch Albumin-Gabe (69,70). Auch wird leitliniengerecht eine antibiotische Primär- bzw. Sekundärprophylaxe empfohlen (69). Trotz antibiotischer Therapie mit Cephalosporinen oder Piperacillin-Tazobactam tritt eine SBP in 70 % der Fälle erneut auf und verschlechtert die Überlebenschancen erheblich. Daher besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieansätzen (71–73).

Der exakte Pathomechanismus der SBP ist nicht bekannt, eine Rolle spielt jedoch die bakterielle Translokation (BT) (74), also die Translokation von lebenden Bakterien sowie bakteriellen Fragmenten bzw. Produkten aus dem Darmlumen in die mesenterialen Lymphknoten (29). Dieser Prozess wird gefördert durch ein abgeschwächtes lokales Immunsystem, Dünndarmfehlbesiedelung sowie eine verminderte mikrobielle Diversität (74). Zu den SBP-verursachenden Keimen zählen sowohl gram-positive Erreger wie Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken als auch gramnegative Erreger wie *Escherichia Coli* (*E. coli*), Klebsiellen, Pseudomonaden und *Proteus Mirabilis* (*P. mirabilis*) (75–77). Zusätzlich trägt eine erhöhte Permeabilität der intestinalen Epithelbarriere maßgeblich zur Entwicklung einer SBP bei. Zell-Zell-Kontakte spielen daher eine zentrale Rolle bei diesem Prozess (78–80). Um die Diagnostik zu verbessern und neue Therapieoptionen für die SBP zu entwickeln, müssen die molekularen Mechanismen der BT im Detail charakterisiert werden, um gezielt neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschreiben erstmals neue pathophysiologische Mechanismen der BT im Kontext einer SBP (81). In Darmbiopsieproben von Patienten mit Leberzirrhose bzw. Kontrollpatienten konnten wir zeigen, dass bei Patienten mit Leberzirrhose die Dicke der Mukusschicht im Kolon reduziert ist. Dies ermöglicht einen

direkten Kontakt von Bakterien mit Epithelzellen. Wir konnten weiterhin zeigen, dass wichtige Zell-Zell-Kontakt-Proteine wie E-Cadherin und Occludin im Darmepithel von Patienten mit Leberzirrhose vermindert vorhanden sind. Hierdurch kommt es zu einer Destabilisierung der epithelialen Barrierefunktion (81). In einem *in vitro* Ko-Kultur-Modell aus Darmepithelzellen und *E. coli* konnten wir analoge Effekte beobachten. Hier führte der direkte Kontakt von Caco-2-Zellen und Bakterien zu einer zeit- und dosisabhängigen Degradation von E-Cadherin und Occludin. Von uns durchgeführte Transwell-Experimente, bei denen die Caco-2-Zellen entweder durch eine 0,4 µm semipermeable Membran von den Bakterien getrennt kultiviert oder direkt als Bakterien-Zell-Ko-Kultur angesetzt wurden, zeigten, dass ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Zellen zur Destabilisierung von E-Cadherin vorhanden sein muss (81,82). Der bakteriell-induzierte Abbau von Occludin erfolgt durch verstärkte Ubiquitinierung über das Proteasom. Für die Spaltung von E-Cadherin ist eine bisher unbekannte bakterielle Proteaseaktivität verantwortlich (81).

Diese Mechanismen tragen gemeinsam dazu bei, dass intestinale Bakterien die Epithelbarriere destabilisieren, die BT fördern und so die Entstehung einer SBP begünstigen. Eine gezielte therapeutische Blockade dieser Prozesse könnte die Integrität der intestinalen Barriere bewahren und somit eine vielversprechende Strategie zur Prävention und Therapie einer SBP darstellen.

1.11 Ziele dieser Arbeit

Die SBP ist eine schwere Komplikation der Leberzirrhose und geht mit einer hohen Mortalität einher. Der Pathomechanismus hinter dieser Erkrankung ist noch nicht abschließend geklärt und daher klinisch höchst relevant. Eine Rolle hierbei spielt die BT, deren Pathophysiologie Gegenstand unserer Untersuchungen ist. Unsere Vorarbeiten zeigen, dass der direkte Kontakt von Bakterien und Epithelzellen zu einer Destabilisierung des Epithels in Form von Degradation wichtiger Zell-Zell-Kontakt-Proteine wie E-Cadherin und Occludin führt. Während wir einen Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Mechanismus für den Abbau von Occludin identifizieren konnten, bleibt bisher unklar, über welchen Prozess die Reduktion / der Abbau von E-Cadherin erfolgt.

Um dies zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

1. Welche Effekte haben SBP-relevante Bakterien auf die Integrität der epithelialen Barriere?

Hierzu wurden Bakterien, die aus dem Aszites von Patienten mit SBP isoliert wurden, mit Caco-2-Zellen ko-kultiviert und deren Effekte auf die Regulation von E-Cadherin und Occludin untersucht.

2. Über welchen Mechanismus erfolgt die Degradation von E-Cadherin in Darmepithelzellen nach direktem Kontakt mit Bakterien?

Um dies zu klären, wurde die Rolle von MMPs bei diesem Mechanismus mittels spezifischer Inhibitoren untersucht. Dabei wurde differenziert zwischen der Rolle zellulärer MMPs (endogene MMPs von Caco-2-Zellen) und bakterieller MMPs.

3. Welche proteolytischen Eigenschaften weisen SBP-relevante Bakterien auf?

Zur Charakterisierung der proteolytischen Eigenschaften SBP-relevanter Bakterien wurden Aktivitätsassays in An- und Abwesenheit von MMP-Inhibitoren durchgeführt.

4. Auswirkung von MMP-Inhibitoren auf die Bakterien-Wirtszell-Interaktion und Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze für die Prävention einer SBP

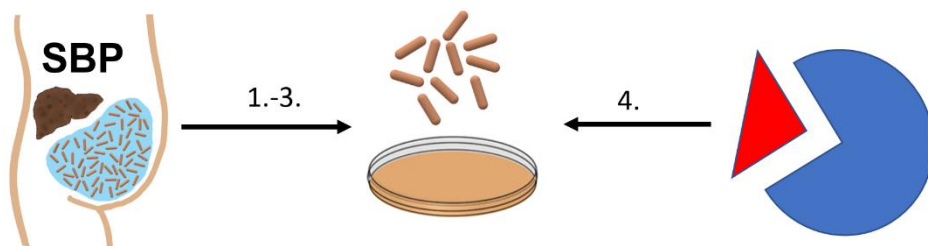


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Grundprinzips dieser Doktorarbeit. (1. – 3.) Untersuchung der Effekte SBP-relevanter Bakterien auf Darmepithelzellen *in vitro*. (4.) Untersuchung der Effekte von MMP-Inhibitoren auf die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Darmepithelzellen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war somit, die Auswirkungen von SBP-relevanten Bakterien auf die Integrität der epithelialen Barriere zu untersuchen, den Mechanismus der E-Cadherin-Degradation nach bakteriellem Kontakt zu klären und die proteolytischen Eigenschaften dieser Bakterien zu charakterisieren, insbesondere in Bezug auf die Rolle von MMPs (Abbildung 5).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Laborbedarf

<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
Analysenwaage Excellence XA 105 Dual Range	Mettler Toledo, Deutschland
BB6220 Inkubator	Heraeus, Deutschland
B. BROWN BIOTECH Certomat IS8865829	EquipNet Inc., USA
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Costar® Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, USA
DUran® Laborglasflaschen	DURAN Group GmbH, Deutschland
Durchflusszytometer BD LSRFortessa	BD Biosciences, USA
Elektrophorese Netzgerät EV261	Consort bvba, Belgien
Emax Plus Mikrotiterplatten Lesegerät	Molecular Devices, USA
Eppendorf Easypet®	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Gefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Multipipette	Eppendorf AG, Deutschland
Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Deutschland
Falcon® Filter 40 µm	Corning, USA
Falcon® Gefäße 15 ml, 50 ml	Corning, USA
Falcon™ Rundboden-Teströhrchen aus Polysterol mit Schnappverschluss und Zellsieb, 5 ml	BD Biosciences, USA
Gelkammer Multigel G44	Biometra GmbH, Deutschland
Grade Whatman 3 mm Chr Fließpapier	GE Healthcare, USA
Infinite M200 PRO	Tecan Trading AG, Schweiz
Kanülen (27G 0,75“)	BD Microlance™, Deutschland
Laborwaage	Satorius Laboratory, Deutschland
Light Cycler® 480 384 well Platte	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cylcer® 480 Siegelfolie	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Light Cycler® 480 System	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

Material und Methoden

Magnetrührer, IKA RH basic 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Mikrotiter-Platten 96-well steril, schwarz	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Deutschland
Millicell®-ERS	Merck Millipore, USA
Millex®-Filter PVDF 0,22 µm und 0,45 µm	Merck Millipore, USA
Minizentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, USA
Multigel Elektrophoresekommer	Biometra GmbH, Deutschland
Nanophotometer IMPLN	Implen GmbH, Deutschland
Parafilm	Sigma-Aldrich, USA
PCR-Gefäße	Kisker Biotech, Deutschland
Pipetman	Gilson, USA
PVDF Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, USA
Rakel, Hand Applikator	Biozym, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli-Q Q-POD	Merck Millipore, USA
Schüttelgerät MTS2/4 digital	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Schüttelinkubator Minitron	Infors AG, Schweiz
Spritzen (10 ml)	Becton, Dickinson and Company, USA
Sterilbank Laminair HB2448	Heraeus, Deutschland
T3 Thermoblock	Biometra GmbH, Deutschland
TC20™ Zählkammer	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
TE77XP Semi-Dry Transfer Unit	Hoefer Inc., USA
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf AG, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Deutschland
TriStar ² LB942 Microplate Reader	BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, Deutschland
Vortexer Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Voyager-Pipetten	Integra, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
Zählkammern für TC20™	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Zellkultur-Flaschen 75 cm ²	Corning, USA

Material und Methoden

Zellkultur-Flaschen 175 cm ²	Eppendorf AG, Deutschland Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellkulturschale TC-Schale 100, Cell+	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellschaber 2-Posit. Klinge 25	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zellsieb 40 µm	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus, Deutschland

2.1.2 Software

<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
ImageJ	National Institute of Health, USA
Image Lab™	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
LightCycler® 480 Version 1,5	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Microsoft Excel 2016	Microsoft, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, USA
SoftMax Pro 7	Molecular Devices, USA
Sigmaplot 14.0	Systat, Deutschland
Zotero 6	Corporation for Digital Scholarship, USA

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Fertigkits

Diese Auflistung beinhaltet die Nicht-Standard-Reagenzien. Standard-Reagenzien sind von handelsüblichen Herstellern bezogen und hier nicht aufgeführt.

<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
1-Butanol	Sigma-Aldrich, USA
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich, USA
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	BD Biosciences, USA
6-Aminohexansäure	Merck Millipore, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Annexin Bindepuffer (10x)	BD Biosciences, USA
APC Annexin V	BD Biosciences, USA

Material und Methoden

Azocasein	Sigma-Aldrich, USA
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	BIOMOL GmbH, Deutschland
cOmplete™ ULTRA, Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
DNAse I	Qiagen, Niederlande
Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS; DPBS)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's PBS + MgCl ₂ + CaCl ₂	Sigma-Aldrich, USA
Essigsäure ROTIPURAN® 100 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
FACSFlow™ Mantelflüssigkeit	BD Biosciences, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio&Sell, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Gradientengel (4–20 %)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
HiMark™ vorgefärbt	Thermo Fisher Scientific, USA
Human MMP-2 (rekombinant)	PeproTech Inc., USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, USA
Kupfer(II)-sulfat-Lösung	Sigma-Aldrich, USA
<i>Luria Broth</i> (LB) Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich, USA anprotec, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland

Material und Methoden

Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumhypochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, USA
Novex™ Zymogramm-Entwicklungspuffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Novex™ Zymogramm-Renaturierungspuffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Page Ruler™ Plus	Thermo Fisher Scientific, USA
p-Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich, USA
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
Pierce Rapid Gold BCA	Thermo Fisher Scientific, USA
Protease Fluorescent Detection Kit	Sigma-Aldrich, USA
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Niederlande
QuantiTect Reverse Transkription (RT) Kit	Qiagen, Niederlande
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer	Sigma-Aldrich, USA
ReBlot Plus Strong Stripping Lösung (10x)	Merck Millipore, USA
Recombinant Human MMP-9 (dimer, carrier-free)	BioLegend, USA
RLT Lysepuffer	Qiagen, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Niederlande
Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Deutschland
Simple Blue Safe Stain	Thermo Fisher Scientific, USA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, USA
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
Trypsin – EDTA Solution	Sigma-Aldrich, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, USA

Material und Methoden

2.1.4 Antikörper

Die für Western Blot Analysen verwendeten Lösungen und Antikörper sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet. Die Antikörper gegen E-Cadherin, HSC 70 und Occludin wurden für mindestens 2 Stunden in einer 5 % igen Milch-Lösung (Tabelle 1) auf Western Blot-Membranen inkubiert, während der Antikörper gegen β -Aktin für 30 Minuten zum Einsatz kam. Die Inkubation des GAPDH-Antikörpers erfolgte für 1 h in 5 %iger BSA-Lösung (Tabelle 1). Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte jeweils in der gleichen Lösung wie die des zugehörigen Primärantikörpers.

Tabelle 1: Verwendete Lösungen für den Western Blot

Lösung	Reagenz
Waschpuffer (PBST)	1x PBS, 0,05 % Tween-20
Milch-Lösung	5 % Milchpulver in Waschpuffer
BSA-Lösung	5 % BSA-Pulver in Waschpuffer

In Tabelle 2 sind die verwendeten Antikörper für den Western Blot aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper (Mensch) für den Western Blot

Antigen	ID / Klon	Hersteller	Verdünnung	Stamm
β -Aktin	A3854	Sigma	1 in 10000	
CDH1	3195/24E10	Cell Signaling Technology	1 in 1000	Kaninchen
GAPDH	G9295	Sigma	1 in 5000	
HSC 70	PA5-27337	Thermo Fisher	1 in 1000	Kaninchen
OCLN	NBP1-87402	Novus Biologics	1 in 1000	Kaninchen

2.1.5 Inhibitoren

Um die Auswirkung von MMP-Inhibitoren auf die Bakterien-Wirtszell-Interaktion zu untersuchen, wurden die folgenden Inhibitoren sofern nicht anders angegeben in einer Endkonzentration von 10 μ M verwendet (Tabelle 3). Hierbei wurden die Zellen 20 min mit den jeweiligen Inhibitoren vorinkubiert, bevor die Ko-Kultur mit Bakterien erfolgte. BB-2516 und BB-94 sind Breitspektrum-MMP-Inhibitoren, während SB-3CT ein selektiver Gelatinase-Inhibitor (MMP-2 und -9) ist und MMP-8-Inhibitor I selektiv MMP-8 blockiert.

Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	ID	Hersteller
BB-2516	HY-12169	Hycultec
BB-94	SML0041	Sigma-Aldrich
SB-3CT	HY-12354	Hycultec
MMP-8-Inhibitor I	CAS 236403-25-1	Santa Cruz

Material und Methoden

2.1.6 qRT-PCR Primer

Für die Analyse der mRNA in der qRT-PCR wurden folgende Primer der Firma Metabion in der Endkonzentration 1 µM eingesetzt (Tabelle 4):

Tabelle 4: Verwendete qRT-PCR-Primer der Firma Metabion

Antigen	Spezies	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
β2MG	Mensch	CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT	CCAATCCAAATGCGGCATATTCA
CDH1	Mensch	ATGAGTGTCCCCGGTATCT	GGTCAGTATCAGCCGCTTTC
GAPDH	Mensch	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	GCTGGTCCAGGGGTCTTACT
MMP-1	Mensch	GCTCATCAACTCGGCCATTCTCTTGGACT	CGGGTAGAAGGGATTGTGCGCATGTA
MMP-3	Mensch	CCGAGAAATGCAGAAGTTCCTTGGATTGG	TCGGGATGCCAGGAAAGTTCTGAAGTG
MMP-10	Mensch	TCTTGCAATCCTTGTGCTGTTG	ATTGCTGGGCAAGATCCTTGT
MMP-13	Mensch	ACACCTACACCGGCAAAAGC	CATTTGTCTGGCGTTTTTGA
MMP-14	Mensch	GGCTGCCTACCGACAAGATT	GTAATCGCTATCCACTGCCC
MUC2	Mensch	ATGCCCTTGCGTCCATAACA	AGGAGCAGTGTCCGTCAAAG
OCLN	Mensch	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT
TIMP-2	Mensch	CCCCAAGCAGGAGTTTCTCGACATCG	TGGACCAGTCGAAACCTTGGAGGCT

Außerdem wurden Primer der Firma Qiagen verwendet (Tabelle 5):

Tabelle 5: Verwendete qRT-PCR-Primer der Firma Qiagen

Antigen	ID
β2m	QT00088935
GAPDH	QT00079247
MMP-7	QT00001456

2.2 Zellkultur

Um Bakterien-induzierte Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte *in vitro* abbilden zu können, wurde das von unserer Arbeitsgruppe etablierte Ko-Kultur-Modell der Caco-2-Zellen verwendet (81). Hierbei handelt es sich um aus einem Kolon-Karzinom stammende Zellen, die Monolayer bilden und daher ein geeignetes Modell zur Betrachtung der intestinalen Barriere darstellen (83,84). Caco-2-Zellen weisen eine Punktmutation (entsprechend einem Stopcodon) im p53-Gen auf. Die Zellen wurden vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.

Die Zellen wurden in MEM + 10 % FCS (hitzeinaktiviert) kultiviert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte im Wasserbad bei 56 °C für 30 min zur Zerstörung der Komplementfaktoren.

Das Auftauen der bei -80 °C gelagerten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden mit frischem Medium überschichtet und für 5 min bei 400xg zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und mit Hilfe eines 40 µm Filters vereinzelt.

Material und Methoden

Caco-2-Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und 1 – 2x wöchentlich 1 zu 3 – 1 zu 5 gesplittet. Hierfür wurden sie mit DPBS gewaschen, mit 1x Trypsin EDTA für 10 – 20 min bei 37 °C abgelöst, mit Medium verdünnt und für 5 min bei 250xg zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet erneut in Medium resuspendiert, gefiltert und die Zellen in neue Flaschen überführt (20 ml mit 1 – 2·10⁵ Zellen / ml).

2.3 Bakterien

2.3.1 Bakterienkulturen

Um die Auswirkung von Bakterien auf Zell-Zell-Kontakte von Darmepithelzellen zu analysieren, wurden verschiedene Bakterienkulturen verwendet. Als interne Referenz diente der Laborstamm *E. coli* ATCC 25922 (O6:Hnt).

Darüber hinaus wurden Bakterienstämme benutzt, die durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg aus dem Aszites von insgesamt 3 Patienten und einer Patientin mit SBP isoliert wurden. Der besseren Lesbarkeit halber wird in dieser Arbeit von Patienten gesprochen. Dabei sind ausdrücklich alle Geschlechter gemeint.

Zur Gewinnung von Einzelkolonien wurde ein Verdünnungsausstrich von 1 ml Aszitesflüssigkeit auf einer Agarplatte angefertigt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienarten wurden durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg bestimmt. Es wurden 3 *E. coli*-Stämme und 1 *P. mirabilis* identifiziert (Tabelle 6). Die Serotypisierung der *E. coli*-Stämme erfolgte durch das Robert-Koch-Institut (Dr. Angelika Fruth, Fachgebiet: Bakterielle darmpathogene Erreger und Legionellen).

Tabelle 6: Verwendete Bakterien

Herkunft	Bakterienstamm	Serotypisierung
Laborstamm	<i>E. coli</i>	O6:Hnt
Patient 1	<i>E. coli</i>	Ont:H41
Patient 2	<i>E. coli</i>	O18:H7
Patient 3	<i>E. coli</i>	Ont:Hnt
Patient 4	<i>P. mirabilis</i>	

Alle Bakterien wurden als Glycerinkulturen bei -80 °C gelagert.

Material und Methoden

2.3.2 Übernachtskultur

Die Bakterien wurden im Verhältnis 1 in 1000 verdünnt in LB0 angesetzt und unter kontinuierlichem Schütteln bei 200 rpm für 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.3 Messung der optischen Dichte

Um die Bakterienzahl zu ermitteln, wurde die optische Dichte (OD) bestimmt. Hierfür wurde die Übernachtskultur 1:7 in LB0 verdünnt und die OD₆₀₀ gemessen. Dadurch konnte mittels einer laborinternen Eichgeraden die Bakterienzahl und das für die Versuche benötigte Volumen für Multiziplicität der Infektion (MOI) 0, 5 und 10 ermittelt werden.

2.4 *In vitro* Modell: Bakterielle Ko-Kultur

Für die Experimente wurden je 10 ml mit $2,5 \cdot 10^5$ Zellen / ml in 10 cm Schalen ausgesät. Für die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zellen / ml ausgesät. Das Vorgehen hierfür war analog zum Splitten der Zellen. Da in Vorarbeiten gezeigt wurde, dass die Zellen nach 6 Tagen einen differenzierten Monolayer mit ausreichend ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten aufweisen (81), wurden entsprechend 6 Tage als Wachstumszeitraum für die Zellen festgesetzt. Ein Mediumwechsel wurde am fünften Tag durchgeführt.

Um die Bakterien in den benötigten Mengen zugeben zu können, wurde die Bakterienkonzentration mittels optischer Dichte bestimmt und das Volumen für MOI 5 und 10 an die Zellzahl angepasst. Bei MOI 0 wurde die entsprechende Menge LB0 eingesetzt.

Für weitere Analysen wurde der Zellüberstand nach 4-stündiger Inkubation abgenommen, 5 min bei 3800xg zentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden nach 3x Waschen mit PBS mittels Zellschaber abgelöst, in PBS suspendiert und 5 min bei 400xg zentrifugiert. Je nach weiterer Analyse folgte eine Extraktion von RNA und Protein aus dem entstandenen Zellpellet oder eine Färbung für die Durchflusszytometrie.

Bei Ko-Kulturversuchen mit *P. mirabilis* wurde eine erhöhte Zelltodrate beobachtet. Daher wurden die abgelösten Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 300xg von den Bakterien getrennt, die im Überstand verblieben. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert und 3x darin gewaschen.

2.5 Molekularbiologische Analysen

2.5.1 Kristallviolett-Färbung zur Darstellung der Zellkonfluenz der Ko-Kultur

Zur Analyse der Zellkonfluenz nach bakterieller Ko-Kultur wurden die Zellen, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, ausgesät, nach 4 h Ko-Inkubation mit *E. coli* O6:Hnt oder *P. mirabilis* mit PBS gewaschen und für 10 min mit 70 %igem Ethanol fixiert. Nach ebenso langer Färbung mit Kristallviolett-Lösung (0,5 % Kristallviolett, 20 % Ethanol) wurden die Schalen mit Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

2.5.2 Analysen auf RNA-Ebene

2.5.2.1 RNA-Isolation

Zur Untersuchung der Bakterien-vermittelten Regulation der Zell-Zell-Kontakt-Gene *CDH1* und *OCN*, der zellulären MMPs (*MMP-1*, *-3*, *-7*, *-10*, *-13*, *-14*) und *TIMP-2* sowie *MUC2* auf RNA-Ebene, wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden 600 µl RLT Lysepuffer auf das Zellpellet (siehe 2.4) gegeben und dieses darin gelöst. Anschließend wurde die RNA mittels Qiagen RNeasy Mini Kit entsprechend des Herstellerprotokolls extrahiert und photometrisch deren Konzentration und Reinheit bestimmt.

2.5.2.2 Chip-Analyse der RNA

Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde diese stichprobenartig mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit von Agilent Technologies gemäß dem Protokoll überprüft.

2.5.2.3 cDNA-Herstellung

Je 2000 ng reine RNA wurden mit Hilfe des Quanti Tec RT Kits von Qiagen in cDNA umgeschrieben und 1:2 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.5.2.4 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde cDNA 1:9 mit einer Mischung aus 0,5 µl forward- und 0,5 µl reverse-Primer (Endkonzentration 1 µM), 3 µl RNase-freiem H₂O und 5 µl Quanti Tec Sybr Green PCR Master Mix versetzt und in technischen Triplikaten in eine 384 well Platte pipettiert. In Tabelle 7 sind die verwendeten Amplifikationsschemata dargestellt.

Die CP-Werte der jeweiligen Gene wurden auf den Mittelwert der Housekeeper-Gene GAPDH und β 2m normalisiert und nach der Delta-Delta-CP-Methode ausgewertet. Mit Ausnahme von *MMP-7* (Qiagen) wurden die Primer von Metabion bezogen.

Tabelle 7: verwendete Amplifikationsschemata qRT-PCR

Gen	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
<i>CDH1, OCLN, MUC2, MMP-1, -3, -10, -13, -14, TIMP-2</i>	Denaturierung	95 °C	8 min	
	Amplifikation	95 °C	1 s	40
		60 °C	15 s	
		72 °C	20 s	
	Kühlung	40 °C		
<i>MMP-7</i>	Denaturierung	95 °C	15 min	
	Amplifikation	95 °C	30 s	40
		58 °C	30 s	
		72 °C	10 s	
	Kühlung	40 °C		

2.5.3 Analysen auf Protein-Ebene

2.5.3.1 Herstellung von Protein-Lysaten

Die Zellpellets (siehe 2.4) wurden je nach Größe in 100 µl–350 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor mini cOmplete suspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4 °C und 17000xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.5.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde anhand der BCA-Methode bestimmt. Hierfür wurden die Proben 1:4 in RIPA-Puffer verdünnt und in Dreifachbestimmung nach Herstellerangaben pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Absorption bei 492 nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Konzentrationsreihe von 0 µg / ml – 2000 µg / ml.

2.5.3.3 Western Blot-Analyse

Um Analysen auf Proteinebene durchführen zu können, wurden Western Blots erstellt. Hierfür wurden die Proben entsprechend ihres Proteingehalts mit RIPA-Puffer verdünnt (je 10 µg Protein) und mit 2x oder 6x Lämmli-Puffer mit DTT versetzt. Anschließend wurden sie zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C inkubiert und für 1 min bei 17000 xg zentrifugiert. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) erfolgte mit 4 – 20 % Fertiggelelektrophorese bei 40 mA und 500 V für 50 – 70 min. Danach wurden die Proteine in einem Semi-Dry-System auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Aufbau erfolgte gemäß Tabelle 8.

Material und Methoden

Tabelle 8: Zusammensetzung der Schichten im Semi-Dry-System

Material	Puffer
1x Filterpapier	Anodenpuffer A
2x Filterpapier	Anodenpuffer B
1x PVDF-Membran	Methanol
1x Gel	Kathodenpuffer C
3x Filterpapier	Kathodenpuffer C

Die Puffer setzten sich wie folgt zusammen (Tabelle 9):

Tabelle 9: Verwendete Puffer im Western Blot

Puffer	Reagenz
Anodenpuffer A	300 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer B	25 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer C	25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4
Waschpuffer	1x PBS mit 0,05 % Tween-20
Detektionslösung	2,5 mM Luminol Na-Salz in DMSO, 0,4 mM P-Coumarinsäure in DMSO, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

Nach dem Blotten folgte eine Inkubation in 5 % Milch in Waschpuffer, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blockieren wurde der Primärantikörper hinzugefügt und die Membran für mindestens 2 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 3x 5 min mit Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3x 5 min wurde die Detektionslösung mit 0,03 % H₂O₂ auf die Membran gegeben und es erfolgte zeitnah die Detektion der Proteine.

Für die Analyse weiterer Proteine wurden die Membranen für 20 min mit 1x Reblot Plus Strong Stripping-Lösung inkubiert und kurz in Wasser gewaschen, bevor erneut geblockt und mit Primär- sowie Sekundärantikörper, wie oben beschrieben, inkubiert wurde.

Als Ladekontrolle diente jeweils β -Aktin. Die Inkubationszeit der Blockier- und Antikörperlösung betrug hier jeweils 30 min.

Die Detektion erfolgte mit dem ChemiDoc™ XRS+ System und Image Lab, für die densitometrische Analyse wurde Image Studio Lite Vers. 5.2 verwendet.

2.5.4 Gelatinzymographie

Als Gelatinasen sind MMP-2 und -9 in der Lage, Gelatin zu degradieren. Dadurch lässt sich ihre Proteaseaktivität in der Gelatinzymographie darstellen. Hierfür wurden Gele entsprechend Tabelle 10 hergestellt.

Da MMPs sowohl von Zellen und Bakterien sezerniert werden können, wurden für die Zymographie sowohl die Überstände der Bakterien-Zell-Ko-Kultur als auch die von Bakteriensuspensionen verwendet. Nach der Methode von Hu & Beeton (85) wurden diese 1:1 mit 2x Lämmli-Puffer ohne DTT versetzt und 1 min bei 17000xg zentrifugiert. Die SDS-Page erfolgte bei 25 mA und 300 W für 20 min und bei 40 mA und 300 W für 40 – 60 min. Anschließend wurden die Gele für 60min in Renaturierungs-Puffer renaturiert und über Nacht in Entwicklungspuffer bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 3x mit Wasser gewaschen und mit Simple Blue Safe Stain für 1 h gefärbt. Nach zweimaligem einstündigen Waschen in Wasser wurden sie belichtet.

Tabelle 10: Gelatingel-Zusammensetzung für 2 Gele

Gel-Bestandteil	Reagenz	Menge
Trenngel	2,65 mg/ml Gelatin	8,3 ml
	1,5 M Tris, pH 8,8	5,25 ml
	30 % Acrylamide-Bisacrylamide	7 ml
	50 % Glycerol	165 µl
	TEMED	10 µl
	10 % APS	100 µl
Sammelgel	H ₂ O	5,5 ml
	30 % Acrylamide-Bisacrylamide	1,3 ml
	1,0 M Tris, pH 6,8	1 ml
	10 % SDS	80 µl
	TEMED	8 µl
	10 % APS	80 µl

2.5.5 Durchflusszytometrische Untersuchung des Bakterien-induzierten Zelltods

Um den Bakterien-induzierten Zelltod der Zellen zu untersuchen, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.4 beschrieben ausgesät und mit Inhibitoren sowie Bakterien versetzt. Nach 4 h Ko-Kultur wurden Überstand und trypsinierte Zellen zentrifugiert, das Zellpellet in 1x Annexin-Bindepuffer resuspendiert, mit je 10 µl APC Annexin V sowie DAPI gefärbt und nach 10 min in Annexin-Bindepuffer 1:1 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Messungen wurden am LSR Fortessa durchgeführt. Die Berechnung des spezifischen Zelltods erfolgte nach der Formel von Devadas et al. (*et alia*; und andere) (86,87).

2.6 Analysen der bakteriellen Aktivität

2.6.1 Azocasein Assay

Für die Messung der bakteriellen Proteaseaktivität in An- und Abwesenheit von MMP-Inhibitoren (Endkonzentration 10 μM und 100 μM) wurde ein Azocasein Assay durchgeführt. Hierfür wurde die OD₆₀₀ der Übernachtskultur bestimmt und $9 \cdot 10^7$ Bakterien in LB0 im Verhältnis 1:2:2 zu Natriumhydrogencarbonat und 2 %iger Azocasein-Lösung (in NaHCO₃) gegeben (Endvolumen 500 μl). Als Referenz diente LB0. Das Azocasein dient als Substrat für bakterielle Proteasen, die es in der nachfolgenden 4-stündigen Inkubationsperiode (37 °C) umsetzen. Anschließend wurde die Reaktion mit 5 %iger Trichloressigsäure abgestoppt, wodurch nicht umgesetztes Azocasein präzipitiert wurde, und erneut bei 37 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10000xg zum Absetzen des Präzipitats wurde die OD des Überstandes in Triplikaten bei 450 nm bestimmt. Als Maß diente eine Aktivitätseinheit, die als Unterschied in der OD₄₅₀ von 0,01 definiert wurde.

2.6.2 FITC-Casein Assay

Eine sensitivere Analyse der bakteriellen Proteaseaktivität erfolgte mittels Protease-Fluorescent Detectin Kit gemäß den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Versuchs entspricht dem des Azocasein Assays. Hierfür wurden $9 \cdot 10^7$ Bakterien (in 10 μl) oder Trypsin (Positivkontrolle) im Verhältnis 1:2:2 mit Inkubationspuffer in An- oder Abwesenheit von MMP-Inhibitoren sowie FITC-Casein Substrat gemischt und für 4 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Aufgrund der geringen Proteaseaktivität von *E. coli* wurde bei diesem Bakterium die dreifache Substratmenge verwendet. Nach Zugabe von je 150 μl 5 %iger Trichloressigsäure und erneuter 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Dunkeln, wurden die Proben 10 min bei 10000xg zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und erneuter Zentrifugation für 5 min 10000xg wurde der Überstand in Triplikaten zu je 2 μl in 200 μl Assay-Puffer pipettiert, um anschließend die Fluoreszenz bei 485 nm / 535 nm zu messen.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel 2016 und Sigmaplot 14.0 durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand von Mittelwerten und Standardabweichung. MOI 0 und behandelte Proben sind hierbei normiert dargestellt, Proben mit bakterieller Stimulation beziehen sich auf die jeweilige unstimulierte Probe.

Material und Methoden

Statistische Signifikanzen wurden mit dem Welch's t-Test, einer One Way Analysis of Variance oder dem Mann-Whitney Rank Sum Test getestet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Folgende Definitionen wurden getroffen:

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Sofern nicht anders vermerkt, beziehen sich die p-Werte auf die unbehandelte Probe.

3 Ergebnisse

3.1 Destabilisierung von epithelialen Zell-Zell-Kontakten durch *E. coli* O6:Hnt
Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung bakterieller Effekte auf die epitheliale Barriere im Darm und wie diese durch Inhibition von MMPs beeinflusst werden. Um die molekularen Mechanismen der Bakterien-Wirt-Zell-Interaktionen zu analysieren wurde ein von uns etabliertes *in vitro* Modell verwendet (Abbildung 6 A) (81). Hierzu wurden Caco-2-Zellen kultiviert und anschließend für 4 h mit Bakterien ko-kultiviert.

Übereinstimmend mit den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe führte die bakterielle Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt zu einer deutlichen Destabilisierung der epithelialen Zell-Zell-Kontakte. Die Menge des AJ-Proteins E-Cadherin war im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant um 31% reduziert, die Menge des TJ-Proteins Occludin war signifikant um 35% niedriger (Abbildung 6 B, C). Interessanterweise blieben die mRNA-Mengen der Gene für E-Cadherin und Occludin weitgehend stabil (Abbildung 6 D). Die bakteriell-vermittelte Reduktion der Zell-Zell-Kontakt-Komponenten E-Cadherin und Occludin findet folglich auf Protein-Ebene statt.

Dass es sich bei der bakteriell-induzierten Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte um einen dosis- und zeitabhängigen Effekt handelt, wurde bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesen (81,82). Ebenso konnten wir zeigen, dass ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Zellen essentiell für die beobachtete Destabilisierung des Darmepithels ist (81). Dieser direkte Kontakt kann nur zustande kommen, wenn die Mukusschichtdicke auf den Epithelzellen stark vermindert ist. Dies kann unter anderem über eine verminderte Mukusproduktion, zum Beispiel über eine geringere Expression des *MUC2*-Gens auftreten. Ob die Mukusproduktion von Caco-2-Zellen durch bakterielle Ko-Kultur beeinflusst wird, wurde daher ebenfalls in unserem *in vitro* Modell untersucht. Im beschriebenen experimentellen Setting wurde kein signifikanter Effekt von *E. coli* O6:Hnt auf die mRNA-Menge von *MUC2* beobachtet (Abbildung 6 D).

Bakteriell vermittelte Veränderungen der Zellviabilität wurden mittels einer Kristallviolettfärbung untersucht. Hierbei werden adhärente Zellen, die als lebende Zellen angesehen werden, fixiert und anschließend angefärbt. Die Zellkonfluenz lässt somit Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen zu. Die Zellkonfluenz und somit die Zellviabilität von Caco-2-Zellen war nach Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt unverändert (Abbildung 6 E).

Ergebnisse

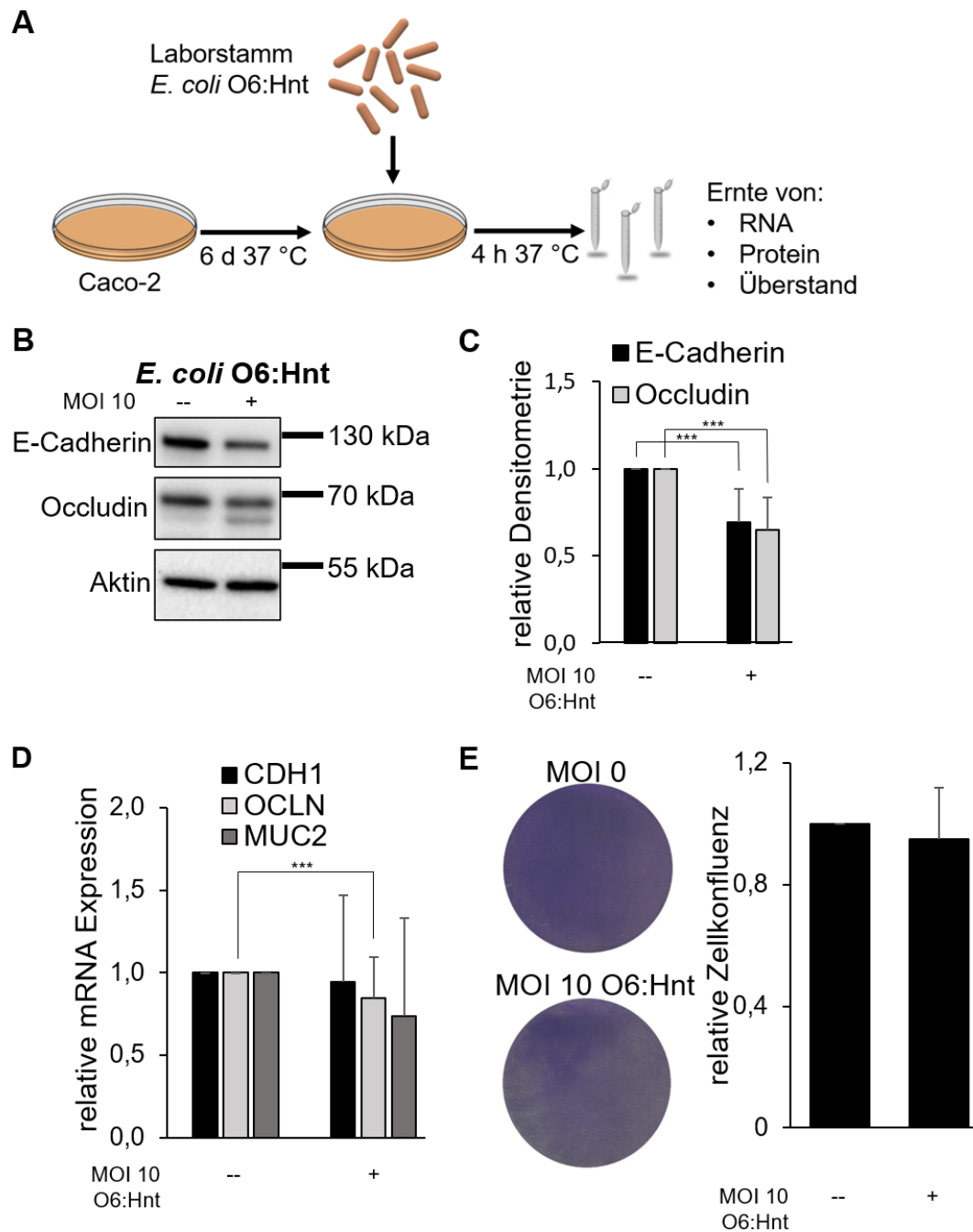


Abbildung 6: Destabilisierung von Zell-Zell-Kontakt-Komponenten durch *E. coli* O6:Hnt. A) Schematische Darstellung des Ko-Kultur-Modells: Stimulation einer 6-Tage-Kultur von Caco-2-Zellen mit *E. coli* O6:Hnt (MOI 10), Ernte von RNA, Protein und Überstand nach 4 h Ko-Kultivierung. (B) Analyse der E-Cadherin- und Occludin-Proteinmengen mittels Western Blot und (C) densitometrischer Auswertung (n= 19, Mann-Whitney Rank Sum Test). (D) Analyse der relativen mRNA Expression von *CDH1* (E-Cadherin), *OCLN* (Occludin) und *MUC2* nach bakterieller Stimulation mit *E. coli* O6:Hnt mittels qPCR (n≥ 6, Mann-Whitney Rank Sum Test). (E) Viabilität der Zellen anhand Kristallviolett-Färbung nach Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt (n= 4).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die bakterielle Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt zu einer signifikanten Reduktion der Zell-Zell-Kontakte E-Cadherin und Occludin auf Proteinebene führt, während die mRNA-Mengen stabil bleiben. Dabei spielen weder eine verminderte Mukusproduktion noch Veränderungen in der Zellviabilität eine wesentliche Rolle bei der bakteriell-induzierten Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte.

Ergebnisse

Um den Mechanismus der Bakterien-induzierten Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte zu analysieren, wurden Filterversuche durchgeführt.

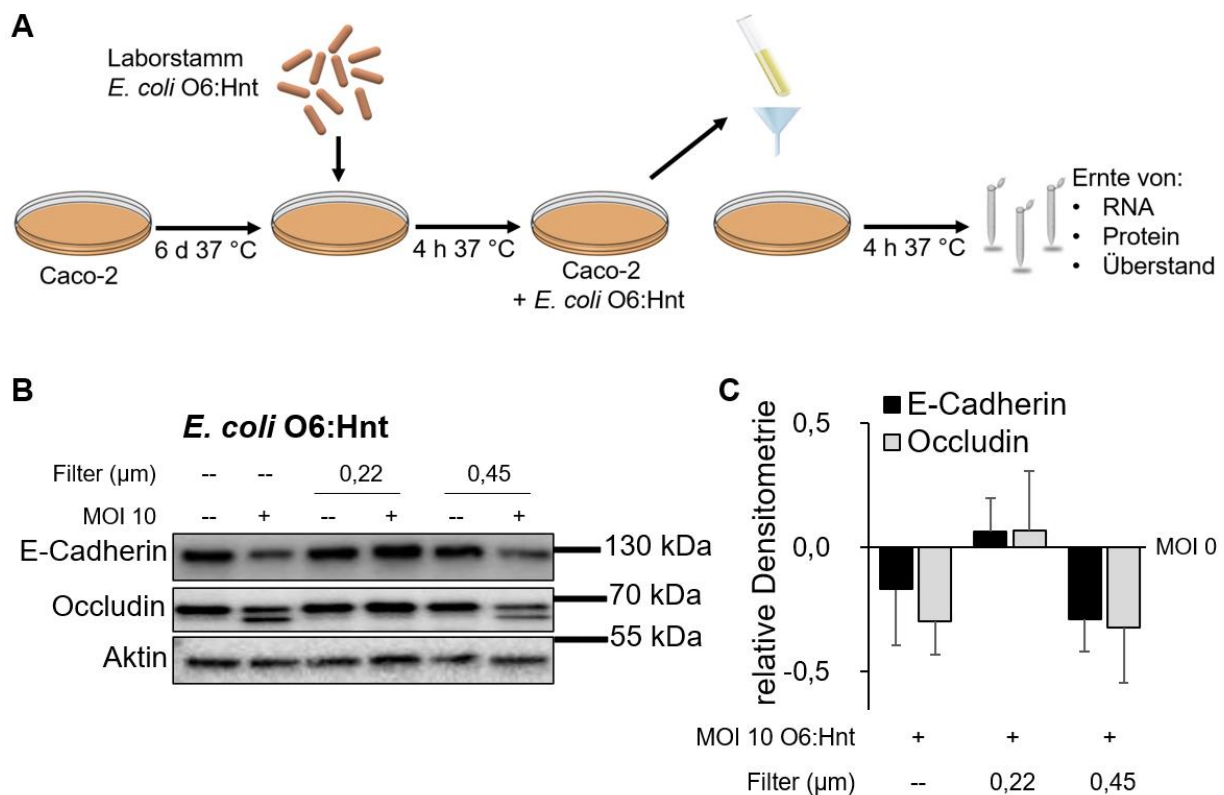


Abbildung 7: Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte durch bakterielle Metabolite. (A) Schematischer Ablauf der Filterversuche: Filtern des Überstandes der Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt (MOI 10) (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm) nach 4 h und erneute vierstündige Inkubation von Caco-2-Zellen mit dem Filtrat. (B) Western Blot-Analyse der E-Cadherin- und Occludin-Proteinmengen in Caco-2-Zellen nach Inkubation mit dem Ko-Kultur-Filtrat mit (C) densitometrischer Auswertung dreier Replikate.

Hierbei wurde der Überstand einer Bakterien-Zell-Ko-Kultur nach 4 Stunden Inkubation gewonnen und mittels 0,22 µm bzw. 0,45 µm Filter gefiltert. Das erhaltene Filtrat mit bakteriellen Metaboliten wurde zur erneuten Inkubation von Caco-2-Zellen für 4 h verwendet (Abbildung 7 A). Anschließend wurden die Effekte auf die Zell-Zell-Kontakt-Proteine mittels Western Blot untersucht. Bei Verwendung eines 0,45 µm Filters zeigte sich durch das Filtrat eine ähnlich starke Reduktion der Proteinspiegel von E-Cadherin und Occludin wie durch den direkten Kontakt mit Bakterien. Nach Inkubation mit dem 0,22 µm Filtrat blieben die Proteinspiegel von E-Cadherin und Occludin hingegen stabil (Abbildung 7 B, C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die direkte Ko-Kultur von Bakterien und Zellen eine / mehrere lösliche Substanz(en) induziert, die für die Reduktion der Zell-Zell-

Ergebnisse

Kontakt-Proteine verantwortlich ist / sind. Diesem Experiment zufolge besitzt die Substanz / besitzen die Substanzen eine Größe von $> 0,22 \mu\text{m}$ und $< 0,45 \mu\text{m}$.

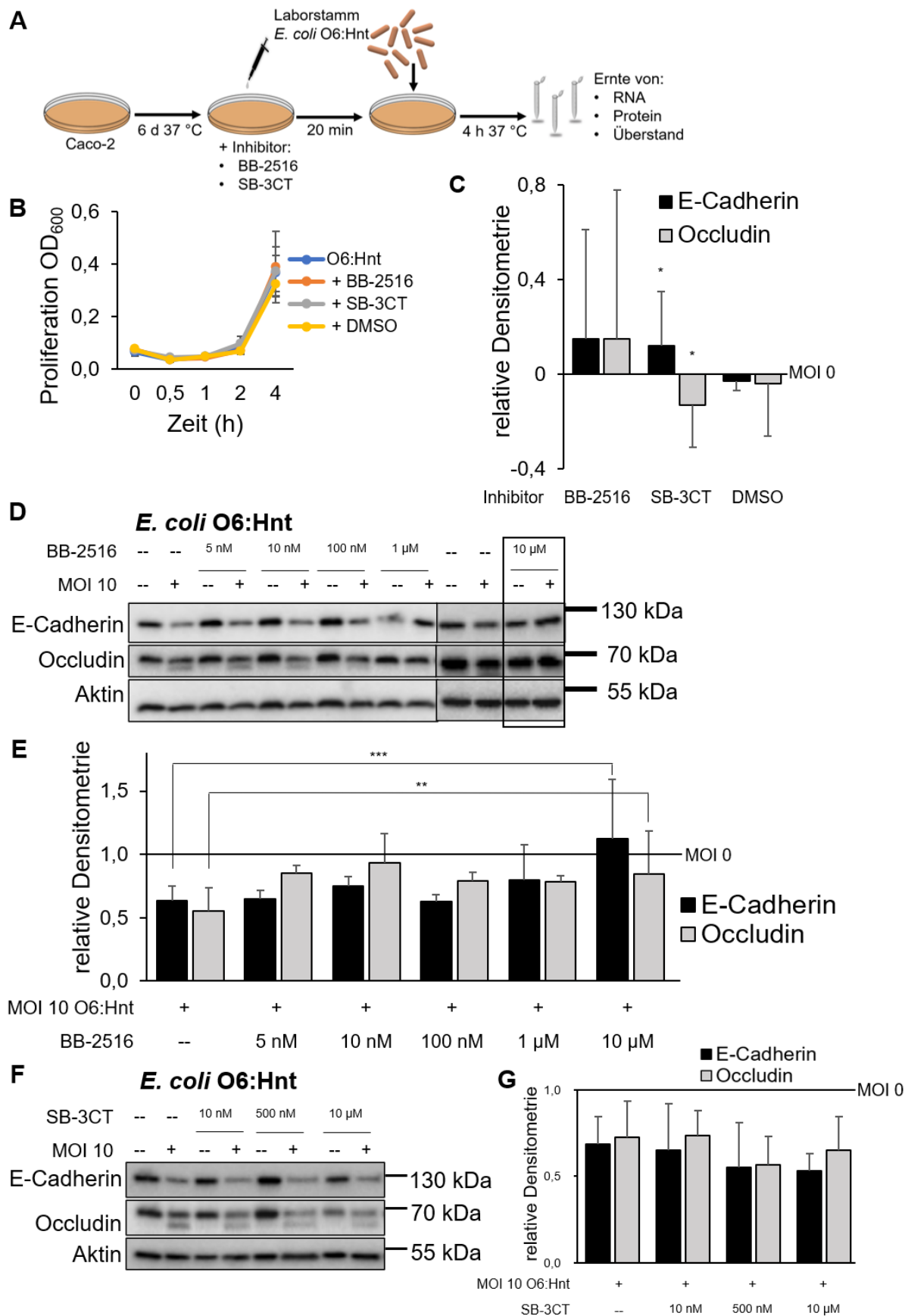
3.2 Stabilisierung von E-Cadherin und Occludin durch MMP-Inhibitoren

Da der direkte bakterielle Kontakt von Bakterien und Epithelzellen zu einem Abbau von E-Cadherin und Occludin führt, untersuchten wir im nächsten Schritt, ob MMPs an diesem Prozess beteiligt sind. Hierzu wurden Ko-Kultur-Experimente in Gegenwart verschiedener MMP-Inhibitoren durchgeführt. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte zu einer 6-Tageskultur von Caco-2-Zellen in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ (sofern nicht anders angegeben), jeweils 20 min vor der bakteriellen Stimulation (Abbildung 8 A).

Neben dem Breitspektrum-MMP-Inhibitor BB-2516 verwendeten wir zudem den selektiven MMP-2 und -9-Inhibitor SB-3CT. Zunächst wurde überprüft, ob diese Wirkstoffe einen direkten Einfluss auf die Proliferation von *E. coli* bzw. auf Zell-Zell-Kontakt-Komponenten von Caco-2-Zellen haben. In Gegenwart beider Inhibitoren blieb das bakterielle Wachstum unverändert gegenüber einer unbehandelten Bakterienkultur (Abbildung 8 B). Darüber hinaus zeigten die getesteten Inhibitoren in Abwesenheit von Bakterien nur minimale Effekte auf die Proteinspiegel der Zell-Zell-Kontakte E-Cadherin und Occludin (Abbildung 8 C). In Vorarbeiten konnten wir für den MMP-Inhibitor BB-94 vergleichbare Effekte auf Bakterienproliferation und die basale Proteinmenge von E-Cadherin und Occludin zeigen (81,82). In unserem *in vitro* Ko-Kultur-Modell bewirkte BB-94 eine Stabilisierung der E-Cadherin-Mengen in Caco-2-Zellen (81). Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob weitere MMP-Inhibitoren (BB-2516 und SB3-CT) in der Lage sind, eine Stabilisierung des Darmepithels zu bewirken. Hierzu wurden entsprechend des Versuchsaufbaus (Abbildung 8 A) Dosistitrationen der Substanzen durchgeführt. Dabei orientierten wir uns an der jeweiligen IC_{50} .

Abbildung 8: Einfluss von MMPs auf die Degradation von Zell-Zell-Kontaktproteinen in Caco-2-Zellen. (A) Experimentelles Design der Inhibitorstudien; Zugabe der Inhibitoren 20 min vor Stimulation mit *E. coli* O6:Hnt. (B) Einfluss der MMP-Inhibitoren auf das Wachstum von *E. coli*. Die Proliferation von *E. coli* O6:Hnt in Gegenwart der MMP-Inhibitoren BB-2516 und SB-3CT (je $10 \mu\text{M}$) wurde über 4 h anhand der OD_{600} bis zu 4 h bestimmt ($n=3$). DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. (C) Einfluss der MMP-Inhibitoren auf Zell-Zell-Kontakte von Caco-2-Zellen. Densitometrische Analyse der Proteinspiegel von E-Cadherin und Occludin in Anwesenheit von BB-2516 ($n=12$), SB-3CT ($n=5$, Mann-Whitney Rank Sum Test) und DMSO ($n=4$). BB-2516 stabilisiert dosisabhängig Zell-Zell-Kontakt-Proteine in Gegenwart von Bakterien. (D) Nach Behandlung mit BB-2516 (5 nM - $10 \mu\text{M}$) für 20 min wurden Caco-2-Zellen mit *E. coli* O6:Hnt (MOI 10) für 4 h ko-kultiviert. E-Cadherin und Occludin wurden mittels Western Blot und (E) densitometrischer Analyse ($n \geq 3$, One Way Analysis of Variance) untersucht. (F) Nach Behandlung mit SB-3CT (10 nM - $10 \mu\text{M}$) für 20 min wurden Caco-2-Zellen mit *E. coli* O6:Hnt (MOI 10) für 4 h ko-kultiviert. E-Cadherin und Occludin wurden mittels Western Blot untersucht. (G) Densitometrische Auswertung dreier Replikate.

Ergebnisse



Ergebnisse

In Anwesenheit von BB-2516 zeigte sich eine dosisabhängige Blockierung der *E. coli*-vermittelten Destabilisierung von E-Cadherin und Occludin. Steigende Konzentrationen von BB-2516 führten zur zunehmenden Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakt-Proteine. Der stärkste Effekt, der die E-Cadherin- und Occludin-Spiegel bis zum Ausgangslevel MOI 0 wiederherstellt, wurde in Gegenwart von 10 μ M BB-2516 erzielt. Aus diesem Grund wurde in allen folgenden Experimenten 10 μ M BB-2516 eingesetzt (Abbildung 8 D, E).

Im Gegensatz zu BB-2516 hatte der Inhibitor SB-3CT keinen rekonstituierenden Effekt auf E-Cadherin und Occludin in unserem *in vitro* Ko-Kultur-Modell. Auch in Gegenwart hoher Konzentrationen von SB-3CT fand ein bakterieninduzierter Abbau der beiden Zell-Zell-Kontakt-Proteine statt (Abbildung 8 F, G). Da SB-3CT ein selektiver Inhibitor von MMP-2 und MMP-9 ist, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass weder MMP-2 noch MMP-9 an der bakterien-vermittelten Degradation von E-Cadherin und Occludin beteiligt sind. Auf eine weitere Verwendung dieses Inhibitors wurde deshalb im weiteren Verlauf des Projekts verzichtet.

Mit dem MMP-8-Inhibitor I wurde ein weiterer selektiver MMP-Inhibitor in das Ko-Kulturmodell integriert und analog zu BB-2516 bzw. SB3-CT untersucht (Abbildung 9 A). In der Analyse des Bakterienwachstums in Anwesenheit des MMP-8-Inhibitors I zeigte sich keine Beeinträchtigung der Proliferation von *E. coli* O6:Hnt, weder bei einer Konzentration von 10 μ M (Daten nicht gezeigt) noch bei 100 μ M. (Abbildung 9 B). Ein direkter Einfluss des MMP-8 Inhibitors I auf den basalen Proteingehalt von E-Cadherin und Occludin konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 9 C).

In der Ko-Kultur von Caco-2-Zellen und *E. coli* O6:Hnt zeigte der MMP-8-Inhibitor I stabilisierende Effekte auf E-Cadherin, während die Occludin-Spiegel weitgehend unbeeinflusst blieben (Abbildung 9 D, E).

Zusammenfassend zeigt sich, dass SB-3CT keinen Einfluss auf die bakterieninduzierte Degradation von E-Cadherin und Occludin in Caco-2-Zellen hat. Durch die Inhibition von MMP-8 gelingt eine Stabilisierung von E-Cadherin. Am ausgeprägtesten ist die Wirkung von BB-2516 (10 μ M), welches die Zell-Zell-Kontakte stabilisiert, ohne das

Ergebnisse

Wachstum der Bakterien oder die basalen Spiegel dieser Proteine in den Zellen zu beeinflussen.

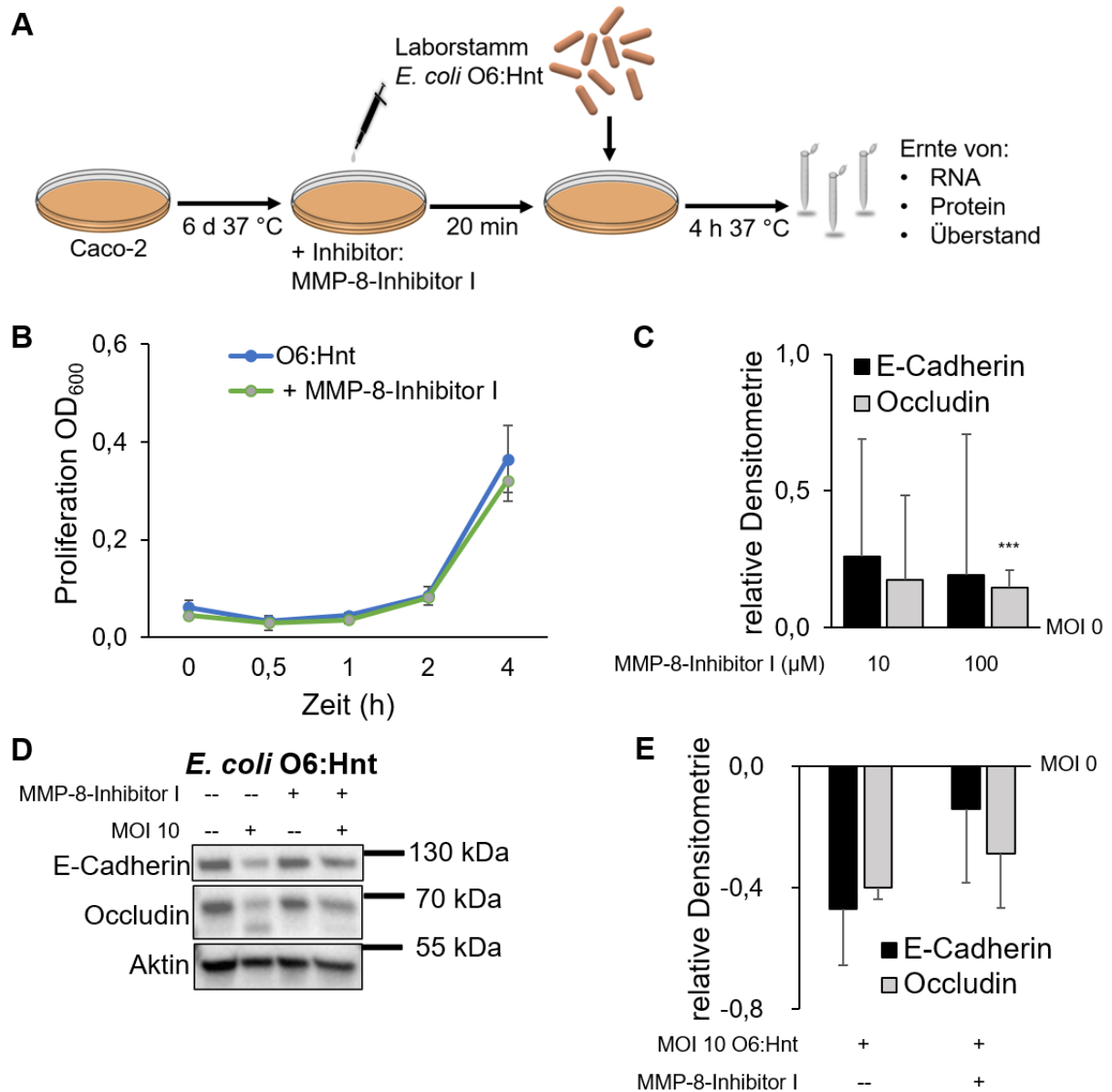


Abbildung 9: Die Inhibition von MMP-8 verhindert die bakteriell-induzierte Degradation von E-Cadherin. (A) Schematische Darstellung der *in vitro* Ko-Kultur in Gegenwart des MMP-8 Inhibitors I. (B) Einfluss von MMP-8 Inhibitor I auf das Wachstum von *E. coli*. Die Proliferation von *E. coli* O6:Hnt in Gegenwart des Inhibitors (100 μM) wurde über 4 h anhand der OD₆₀₀ bis zu 4 h bestimmt (n=3). (C) Einfluss von MMP-8 Inhibitor I auf Zell-Zell-Kontakte von Caco-2- Zellen. Densitometrische Analyse der Proteinspiegel von E-Cadherin und Occludin in Anwesenheit von MMP-8 Inhibitor I (10 μM und 100 μM) (n≥ 3, Mann-Whitney Rank Sum Test). (D) Nach Behandlung mit MMP-8 Inhibitor I (10 μM) für 20 min wurden Caco-2-Zellen mit *E. coli* O6:Hnt (MOI 10) für 4 h ko-kultiviert. E-Cadherin und Occludin wurden mittels Western Blot untersucht. (E) Densitometrische Auswertung dreier Replikate.

3.3 Bakterielle Proteaseaktivität als Zielsubstrat der MMP-Inhibitoren

Angesichts der protektiven Wirkung von BB-2516 und MMP-8-Inhibitor I auf wichtige Zell-Zell-Kontakte des Darmepithels, untersuchten wir, ob zelluläre MMPs für die Destabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich sind. Überraschenderweise

Ergebnisse

wurde jedoch weder die Genexpression der zellulären *MMP-1*, -3, -7, -10, -13 und -14 sowie *TIMP-2*, dem natürlichen Inhibitor der MMPs, (Abbildung 10 A) noch die Gelatinase-Aktivität der endogenen MMPs (Abbildung 10 B) durch die Ko-Kultur von Caco-2-Zellen mit *E. coli* induziert.

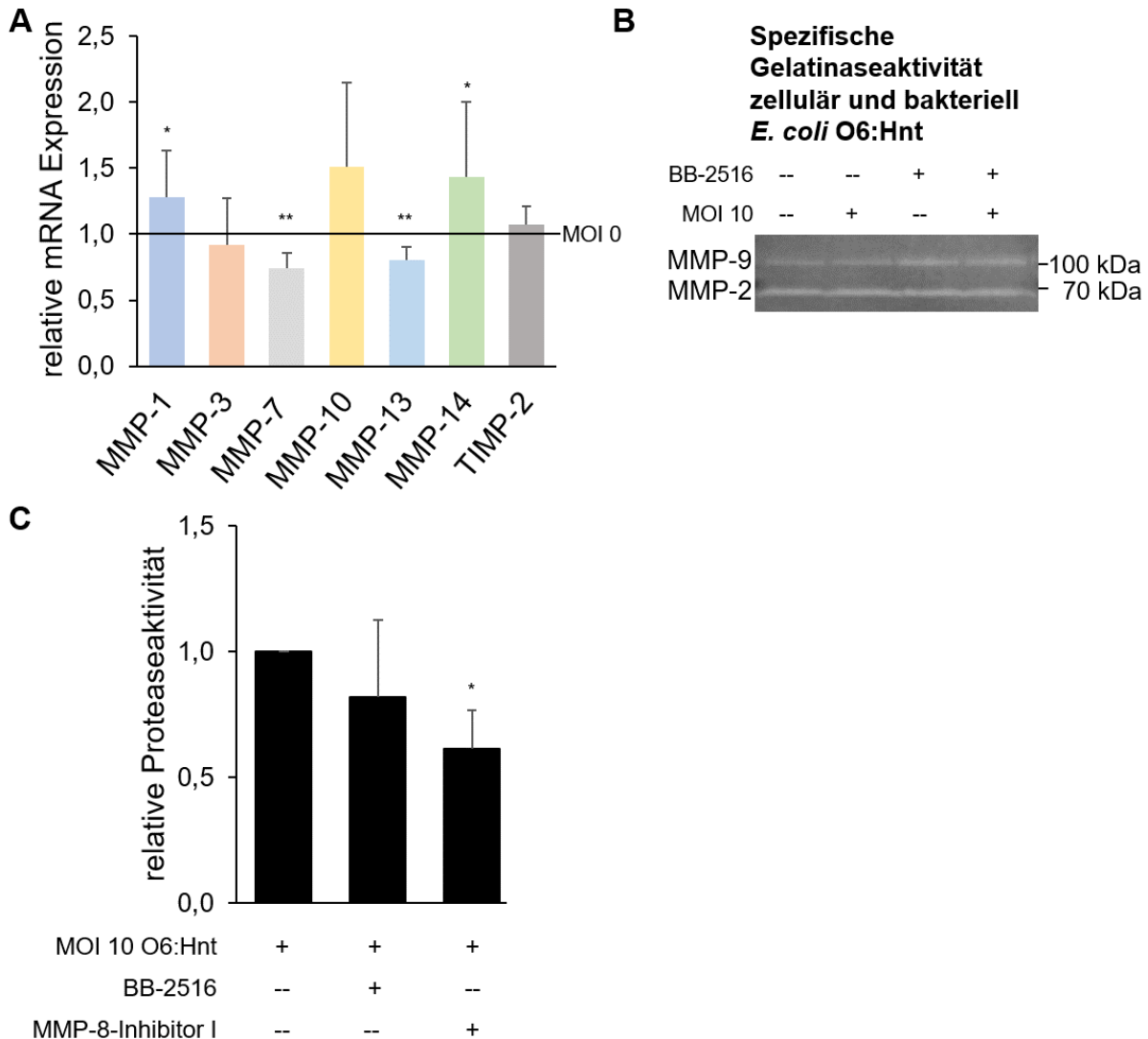


Abbildung 10: Bakterielle Proteaseaktivität als Zielsubstrat von MMP-Inhibitoren. (A) Analyse der mRNA Expression von *MMP-1*, -3, -7, -10, -13, -14 und *TIMP-2* nach vierstündiger Ko-Kultur von Caco-2-Zellen mit *E. coli* O6:Hnt (MOI 10) (n= 7, Mann-Whitney Rank Sum Test, Welch's t-Test). (B) Gelatinzymographie mit spezifischer MMP-2 / -9 Gelatinaseaktivität in An- und Abwesenheit von *E. coli* O6:Hnt bzw. BB-2516 (10 µM). Ein Gelatin-haltiges Polyacrylamid-Gel wurde mit Überständen (ko-)kultivierter Caco-2-Zellen beladen und nach entsprechender Inkubation ge- und entfärbt. Die Gelatinaseaktivität ist als helle Bande auf blauem Hintergrund erkennbar. Dargestellt ist ein repräsentatives Gel aus insgesamt 3 Experimenten. (C) Relative Proteaseaktivität von *E. coli* O6:Hnt in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren BB-2516 oder MMP-8-Inhibitor I (je 10 µM) im Azocasein Assay normalisiert auf die Proteaseaktivität des Keimes (n= 3, Welch's t-Test).

Es zeigte sich eine generelle Gelatinaseaktivität der Caco-2-Zellen ohne bakterielle Stimulation, die bei Zugabe von BB-2516 unverändert blieb. Die Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt bewirkte keine Zunahme der Aktivität von MMP-2 und -9 (Abbildung 10 B).

Ergebnisse

Dies deutet darauf hin, dass zelluläre MMPs nicht die Vermittler des bakteriell induzierten Abbaus von E-Cadherin sind. Unsere Hypothese war daher, dass bakterielle Proteasen für den Abbau von E-Cadherin verantwortlich sein könnten. Im Azocasein Assay zeigte sich eine insgesamt geringe Proteaseaktivität von *E. coli* O6:Hnt, die sich mittels MMP-8 Inhibitor I, nicht hingegen mit BB-2516 reduzieren ließ (Abbildung 10 C).

Somit zeigt sich keine Induktion oder verstärkte Aktivität zellulärer MMPs in der Ko-Kultur mit *E. coli* O6:Hnt, dahingegen weist das Bakterium selbst eine Proteaseaktivität auf, welche durch den MMP-8-Inhibitor I reduziert werden kann.

3.4 Destabilisation der intestinalen Darmbarriere durch klinisch relevante SBP-Bakterien

Um die klinische Relevanz der bakteriellen Effekte auf Zell-Zell-Kontakte zu untersuchen, wurden im Folgenden nicht der Laborstamm *E. coli* O6:Hnt, sondern auch Isolate aus Aszitesdrainagen von Patienten mit Leberzirrhose und SBP in die Analysen integriert. Mit Hilfe unseres *in vitro* Ko-Kultur-Modells untersuchten wir die Effekte der Isolate auf die Zell-Zell-Kontakt-Proteine E-Cadherin und Occludin in An- und Abwesenheit von MMP-Inhibitoren (Abbildung 11 A).

Mit einer Reduktion des Protein-Gehalts von E-Cadherin um 70 % und Occludin um 60 % bewirkte *E. coli* Ont:H41 eine ausgeprägte Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte. Dieser Effekt ließ sich im Fall von E-Cadherin sowohl durch BB-2516 als auch MMP-8-Inhibitor I stabilisieren (Abbildung 11 B, C). *E. coli* O18:H7 bewirkte eine ähnlich starke Degradation von E-Cadherin und Occludin. Die bakteriell-induzierte Reduktion von E-Cadherin war in Gegenwart von BB-2516 vollständig verhindert, in Gegenwart von MMP-8 Inhibitor I teilweise blockiert (Abbildung 11 D, E). *E. coli* Ont:Hnt führte hingegen zu keiner Reduktion von E-Cadherin und Occludin (Abbildung 11 F, G).

Zusammengefasst sind einige, aber nicht alle der SBP-relevanten *E. coli*-Isolate aus Patienten in der Lage, die Zell-Zell-Kontakte zu destabilisieren. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die destabilisierenden Effekte von SBP-relevanten Bakterien individuell unterschiedlich sein können. Sofern eine Destabilisierung – insbesondere durch den Abbau von E-Cadherin – stattfindet, lässt diese sich durch Zugabe von MMP-Inhibitoren reduzieren.

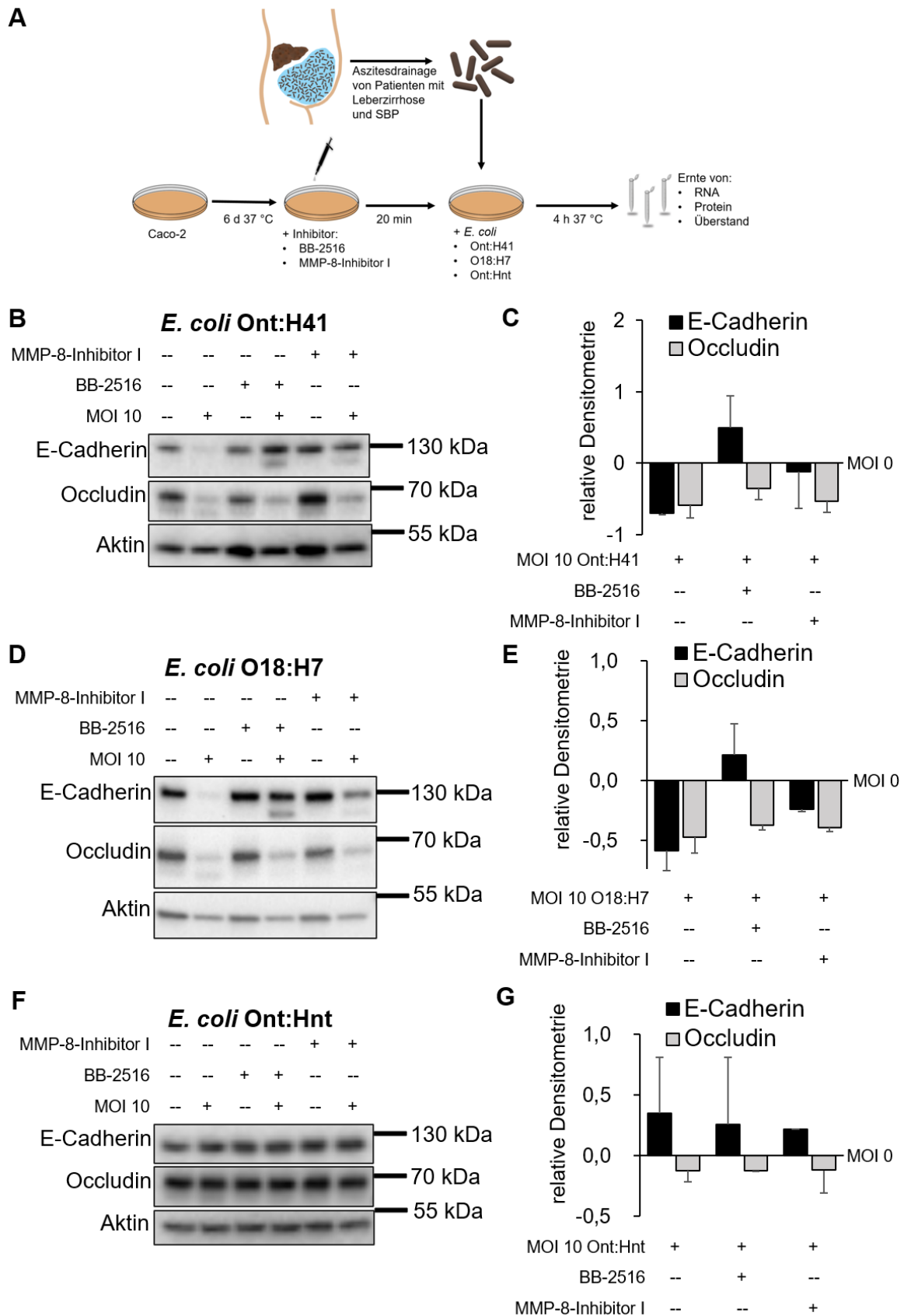


Abbildung 11: Destabilisierende Effekte von SBP-relevanten *E. coli* Isolaten auf intestinale Zell-Zell-Kontakte. (A) Isolation von verschiedenen *E. coli*-Stämmen aus dem Aszites von Patienten mit Leberzirrhose und SBP und deren Einsatz im *in vitro* Ko-Kultur-Modell. Regulation der Proteinspiegel von E-Cadherin und Occludin in Caco-2-Zellen sowie densitometrische Auswertung zweier Replikate nach Ko-Kultur mit (B, C) *E. coli* Ont:H41, (D, E) *E. coli* O18:H7 und (F, G) *E. coli* Ont:Hnt (je MOI 10) in An- und Abwesenheit von 10 µM BB-2516 oder MMP-8-Inhibitor I.

Ergebnisse

Analog zu *E. coli* O6:Hnt wurde die bakterielle Proteaseaktivität der *E. coli*-Isolate in Anwesenheit der MMP-Inhibitoren BB-2516 und MMP-8 Inhibitor I mittels Azocasein Assay und FITC-Casein Assay untersucht. Im Azocasein Assay zeigte sich auch bei den Isolat aus Patienten eine generell sehr niedrige Proteaseaktivität. Im Fall von *E. coli* O18:H7 war die Proteaseaktivität in Gegenwart beider Inhibitoren reduziert. MMP-8 Inhibitor I führte zu einer signifikanten Reduktion der Proteaseaktivität (Abbildung 12 A). Im FITC-Casein Assay wurde die Proteaseaktivität von *E. coli* O18:H7 durch beide Inhibitoren signifikant reduziert (Abbildung 12 B). Diese Daten bestätigen auf der Ebene von *E. coli*-Isolaten aus dem Aszites von Patienten mit SBP, dass die bakterielle Proteaseaktivität eine Sensitivität gegenüber den MMP-Inhibitoren BB-2516 und MMP-8 Inhibitor I aufweist.

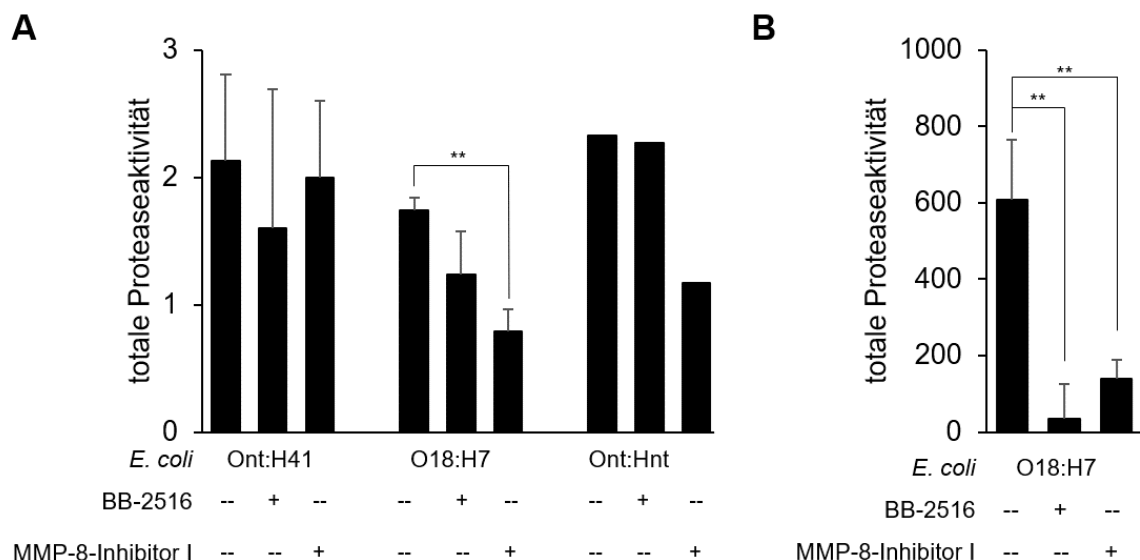


Abbildung 12: Proteaseaktivitäten SBP-relevanter *E. coli*-Stämme. Totale Proteaseaktivität von *E. coli* Ont:H41, O18:H7 und Ont:Hnt in An- und Abwesenheit von BB-2516 und MMP-8-Inhibitor I (10 µM) im (A) Azocasein Assay (n= 1 – 4, One Way Analysis of Variance) und (B) FITC-Casein Assay (*E. coli* O18:H7, n= 3, One Way Analysis of Variance).

Um unsere Beobachtung zu verallgemeinern, dass eine bisher unbekannte bakterielle Proteaseaktivität für den Abbau von E-Cadherin verantwortlich ist, weiteten wir unsere Untersuchungen auf weitere Bakterienspezies aus, die an der Pathogenese der SBP beteiligt sind. Aus dem Aszites eines Patienten mit Leberzirrhose und SBP konnten wir einen *P. mirabilis*-Stamm isolieren (Abbildung 13 A). Dieses Gram-negative Bakterium (88) verfügt über eine ausgeprägte Fähigkeit zur Degradation verschiedener Substrate (89). Analog zu den vorherigen Experimenten untersuchten wir die Effekte von *P. mirabilis* auf die Zell-Zell-Kontakte von Caco-2-Zellen sowie den Einfluss von

Ergebnisse

MMP-Inhibitoren auf die Degradation von Zell-Zell-Kontakten im Ko-Kultur-Modell und die Proteaseaktivität des Keims.

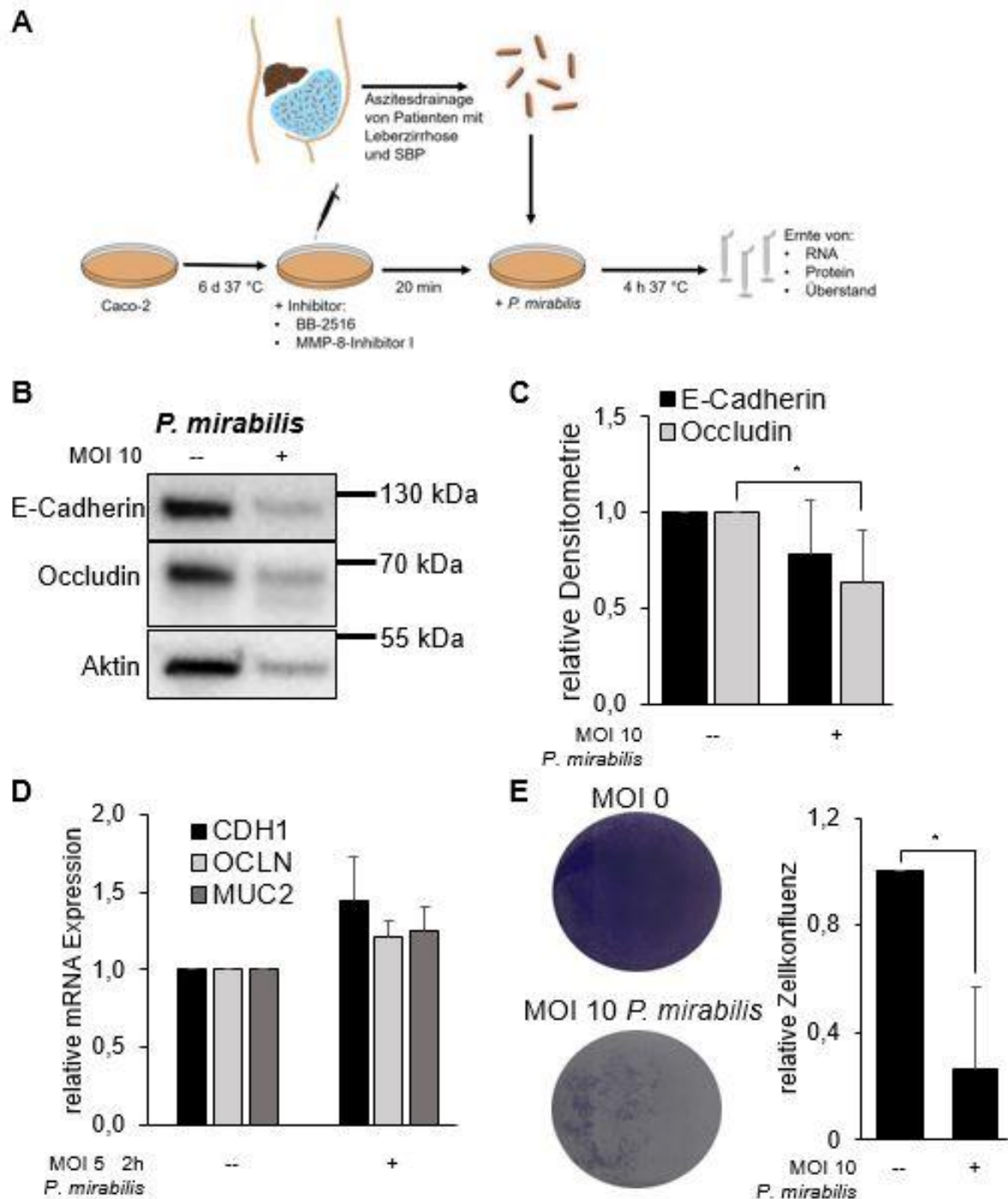


Abbildung 13: Destabilisierung von Zell-Zell-Kontakten in Caco-2-Zellen durch einen SBP-relevanten *P. mirabilis*-Stamm. (A) Extraktion von *P. mirabilis* aus dem Aszites eines Patienten mit Leberzirrhose und SBP, schematische Darstellung des Ablaufs im Ko-Kultur-Modell. (B) Regulation der Proteinspiegel von E-Cadherin, Occludin und β -Aktin in Caco-2-Zellen nach Ko-Kultur (4 h) mit *P. mirabilis*, untersucht mittels Western Blot mit (C) densitometrischer Auswertung von sieben Replikaten (Mann-Whitney Rank Sum Test). (D) Relative mRNA Expression von *CDH1* (E-Cadherin), *OCLN* (Occludin) und *MUC2* in Caco-2-Zellen nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* (MOI 5, Ernte nach 2 h, n= 3). (E) Viabilität von Caco-2-Zellen nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* (MOI 10), dargestellt mittels Färbung der adhärennten Zellen mit Kristallviolett (n= 4, Mann-Whitney Rank Sum Test).

Ergebnisse

Die Ko-Kultur mit *P. mirabilis* führte auf Protein-Ebene, nicht aber auf RNA-Ebene (Abbildung 13 D) zu einer ausgeprägten Reduktion von E-Cadherin und Occludin sowie der Ladekontrolle β -Aktin (Abbildung 13 B, C). Darüber hinaus war eine starke Reduktion der Zellviabilität zu beobachten (Abbildung 13 E).

Analog zu den Experimenten mit *E. coli*, hatte die Anwesenheit von MMP-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Proliferation von *P. mirabilis* (Abbildung 14 A).

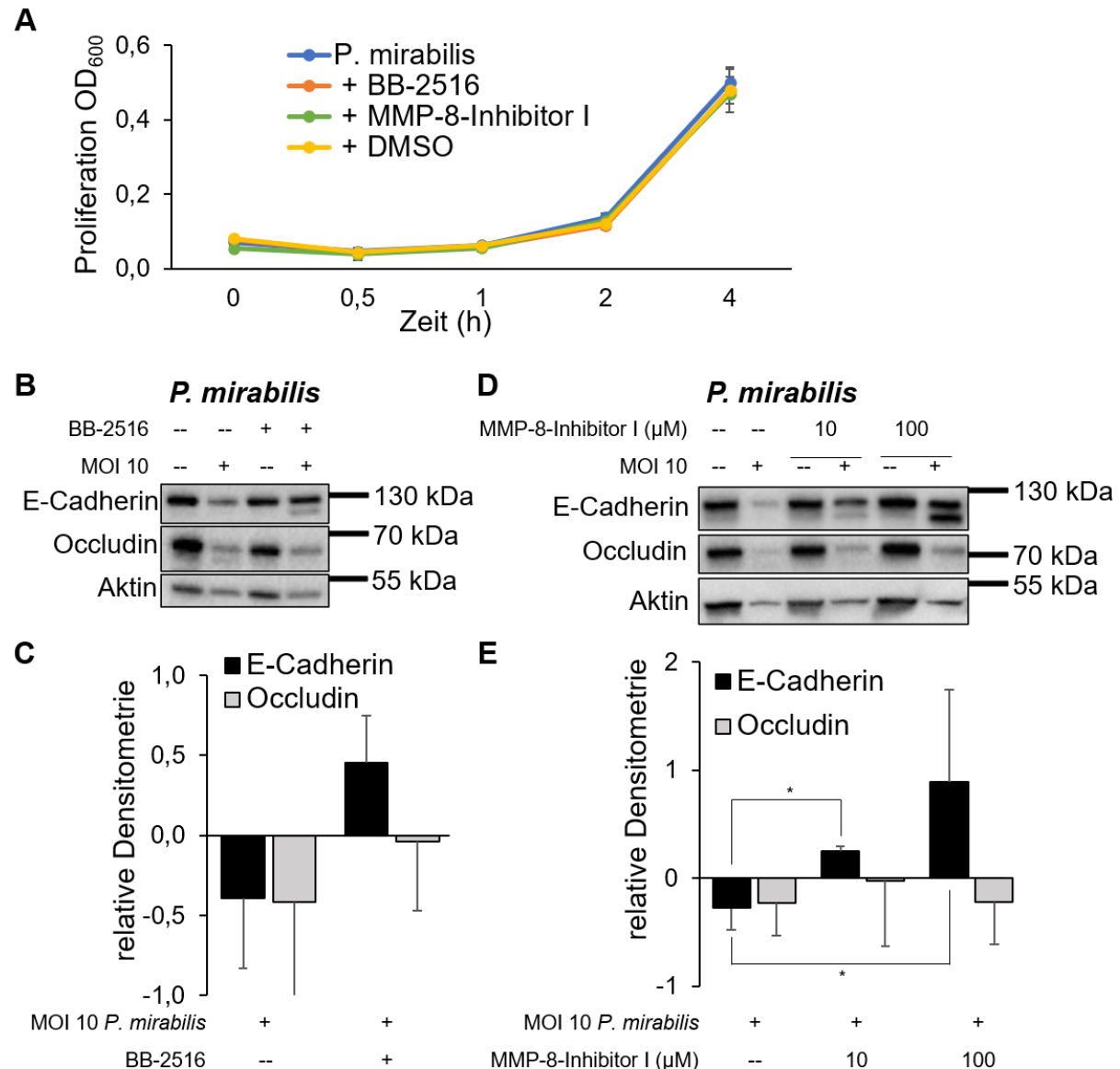


Abbildung 14: MMP-Inhibitoren stabilisieren den E-Cadherin-Proteinspiegel in der Ko-Kultur mit SBP-relevantem *P. mirabilis*. (A) Einfluss von MMP-Inhibitoren auf das Wachstum von *P. mirabilis*. Die Proliferation von *P. mirabilis* in Gegenwart von BB-2516 (10 μ M), MMP-8-Inhibitor I (100 μ M) und DMSO (n= 3) wurde über 4 h anhand der OD₆₀₀ bis zu 4 h bestimmt. Stabilisierung von E-Cadherin durch (B, C) BB-2516 und (D, E) MMP-8-Inhibitor I (je 10 μ M und 100 μ M) in Caco-2-Zellen nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* (MOI 10) auf Proteinebene (n= 3, One Way Analysis of Variance).

Ergebnisse

Übereinstimmend mit unseren Vordaten (81) hatte die MMP-Inhibition in der Ko-Kultur keinen Einfluss auf die *P. mirabilis*-induzierte Degradation von Occludin. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Gegenwart von BB-2516 bzw. MMP-8-Inhibitor I eine verminderte *P. mirabilis*-induzierte Reduktion von E-Cadherin. Interessanterweise wurde in den Proben der Ko-Kultur-Experimente mit *P. mirabilis* und MMP-Inhibitoren ein zweites, etwas kleineres, E-Cadherin-Fragment im Western Blot detektiert (Abbildung 14 B-E).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass auch der aus Aszites isolierte *P. mirabilis* Stamm eine BB-2516- und MMP-8-Inhibitor I-sensitive Proteaseaktivität aufweist, die zum Abbau von E-Cadherin führt.

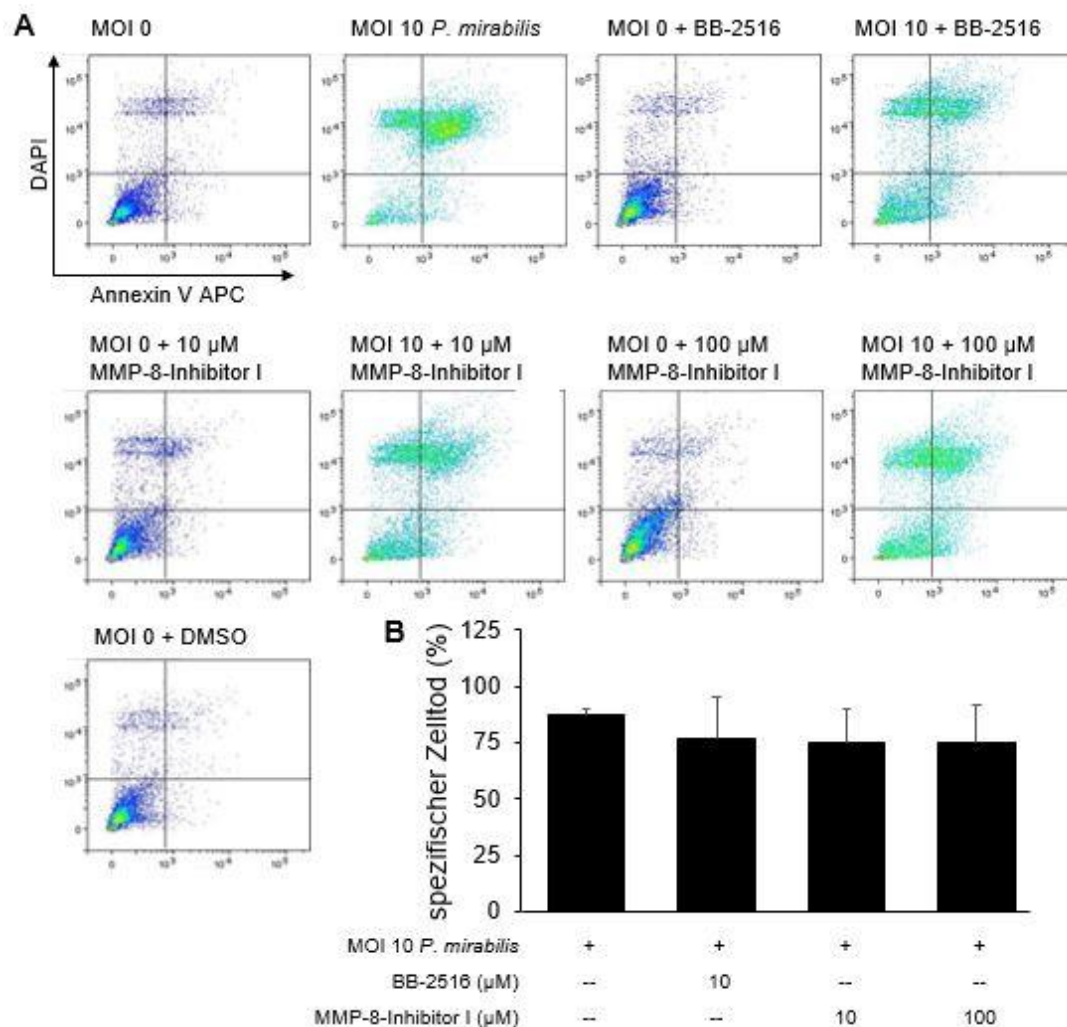


Abbildung 15: Der *P. mirabilis*-induzierte Zelltod ist unabhängig von der bakteriellen Proteaseaktivität. (A) Durchflusszytometrische Analyse des *P. mirabilis*-induzierten Zelltods von Caco-2-Zellen nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* (MOI 10; 4h) in An- und Abwesenheit der MMP-Inhibitoren BB-2516 (10 µM) und MMP-8-Inhibitor I (10 µM und 100 µM) sowie DMSO mit (B) Berechnung des spezifischen Zelltods (n= 2).

Ergebnisse

Nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* beobachteten wir eine reduzierte Zellviabilität der Caco-2-Zellen (Abbildung 13 E). Um zu klären, ob die Stabilisierung des Proteingehalts der Zell-Zell-Kontakte auf einen reduzierten *P. mirabilis*-induzierten Zelltod zurückzuführen ist, wurde der spezifische Zelltod der ko-kultivierten Caco-2-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. *P. mirabilis* bewirkte einen spezifischen Zelltod von 87 %, welcher sich durch Zugabe der MMP-Inhibitoren nicht deutlich reduzieren ließ (vgl. Abbildung 15 A, B). Die *P. mirabilis*-induzierten Effekte auf Zell-Zell-Kontakt-Proteine und Zelltod finden somit unabhängig voneinander statt.

Analog zum Laborstamm *E. coli* O6:Hnt wurde die Aktivität zellulärer und bakterieller Proteasen von bzw. nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* untersucht. Auf zellulärer Ebene wurden verschiedene MMPs sowie TIMP-2 in der qPCR analysiert. Die bakterielle Proteaseaktivität wurde in einem Azocasein Assay in An- und Abwesenheit der MMP-Inhibitoren evaluiert.

Nach Ko-Kultur mit *P. mirabilis* zeigte sich in Caco-2-Zellen auf RNA-Ebene keine signifikante Veränderung der Expression von MMP-1, -3, -7, -10, -13 und -14 sowie TIMP-2 (Abbildung 16 A). Diese zellulären MMPs sind demnach nicht verantwortlich für die Degradation der Zell-Zell-Kontakte.

Beim Azocasein Assay zeigte sich im Vergleich zu *E. coli* O6:Hnt eine 10-fach erhöhte Proteaseaktivität von *P. mirabilis* (Daten nicht gezeigt). Diese Proteaseaktivität wurde durch die Zugabe von BB-2516 oder MMP-8-Inhibitor I (100 µM) stark reduziert (Abbildung 16 B).

Weitere Analysen der Proteaseaktivität erfolgten mittels Gelatinzymographie. Als Positivkontrollen dienten rekombinante menschliche MMP-2 und -9 (Abbildung 16 C). Anders als bei *E. coli* konnte bei *P. mirabilis* nicht nur die zelluläre MMP-2/-9 Aktivität sondern auch eine bakterielle Gelatinase-Aktivität (in An- und Abwesenheit der Zellen) nachgewiesen werden. Während sich die reine bakterielle Aktivität auf eine spezifische Bande bei 55 kDa beschränkte, wurden nach Zellkontakt mehrere Aktivitäten, verteilt über einen Bereich von 110 kDa bis 50 kDa, detektiert. Diese Gelatinaseaktivität wurde durch BB-2516 nicht beeinflusst.

Somit zeigt auch das SBP-Isolat von *P. mirabilis* eine (Gelatin-spaltende) Proteaseaktivität, die zum Teil die durch MMP-Inhibitoren blockiert werden kann.

Ergebnisse

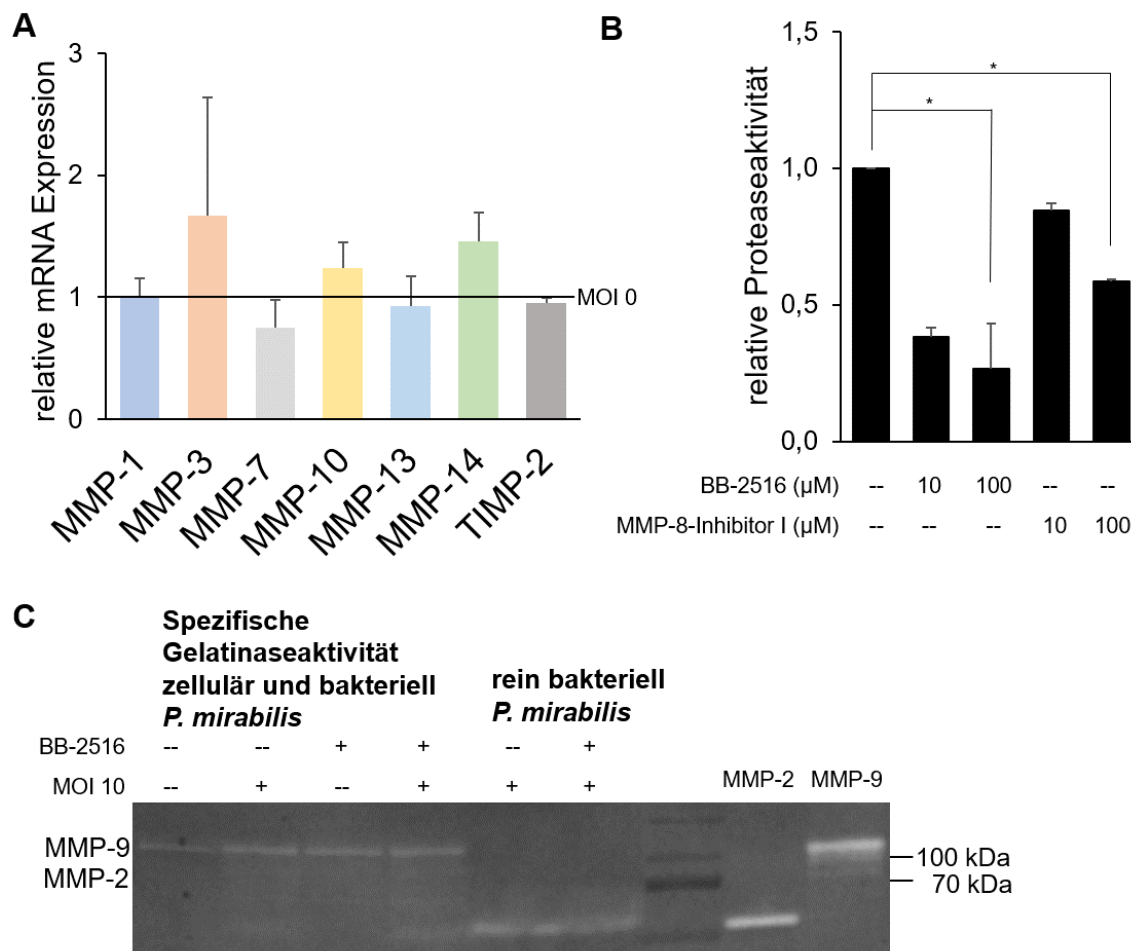


Abbildung 16: Reduktion der Proteaseaktivität von *P. mirabilis* durch MMP-Inhibitoren (A) Analyse der relativen mRNA Expression von *MMP-1*, *-3*, *-7*, *-10*, *-13*, *-14* und *TIMP-2* von Caco-2-Zellen stimuliert mit *P. mirabilis* (MOI 5, 2 h) (n= 3). (B) Relative Proteaseaktivität von *P. mirabilis* in An- und Abwesenheit von BB-2516 und MMP-8-Inhibitor I (je 10 μM und 100 μM) dreier Replikate (One Way Analysis of Variance). (C) Darstellung der spezifischen zellulären und bakteriellen Gelatinaseaktivität mit bzw. von *P. mirabilis* in einer Gelatinzymographie. Als Positivkontrollen dienten rekombinante Gelatinase: MMP-2 und -9 (n= 1 – 4).

Insgesamt zeigen also nicht nur der Laborstamm *E. coli* O6:Hnt, sondern insbesondere Isolate aus dem Aszites von SBP-Patienten ausgeprägte destabilisierende Eigenschaften auf Zell-Zell-Kontakte von Darmepithelzellen. Diese Effekte sind u.a. auf eine bakterielle Proteaseaktivität zurückzuführen, die zur Degradation von E-Cadherin führt und eine Sensitivität gegenüber MMP-Inhibitoren aufweist.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit den destabilisierenden Effekt SBP-relevanter Bakterien auf die wichtigen Zell-Zell-Kontakt-Proteine E-Cadherin und Occludin im *in vitro* Ko-Kultur-Modell mit Caco-2-Zellen. Für die Reduktion dieser Proteine ist ein direkter Kontakt zwischen Bakterien und Zellen nötig. Für die Degradation von E-Cadherin ist eine bisher unbekannte bakterielle Protease verantwortlich. Wir konnten zudem zeigen, dass BB-2516 und der MMP-8-Inhibitor I die bakterielle Proteaseaktivität verschiedener Bakterien blockieren und damit in der Lage sind, das intestinale Epithel im Ko-Kultur-Modell zu stabilisieren.

4 Diskussion

4.1 SBP als schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose

Mit einer Inzidenz von 10 – 30% bei hospitalisierten Patienten mit Leberzirrhose und Aszites, einer 1-Jahres-Mortalität von bis zu 40% (90) und einer mit 70% sehr hohen Wahrscheinlichkeit wiederholt aufzutreten, stellt die SBP eine schwere Erkrankung und Herausforderung in der Diagnostik und Therapie dar (68,91,92).

Das Krankheitsbild der SBP ist sehr variabel. Es kann mit einem fulminanten Krankheitsverlauf mit Bauchschmerzen, Fieber und Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten einhergehen (67), jedoch auch symptomlos verlaufen. Daher geht man von einer hohen Dunkelziffer aus (92).

Die frühzeitige Diagnose und Therapie der SBP ist daher für die Prognose der Patienten entscheidend. Aktuell erfolgt die Therapie der SBP leitliniengerecht antibiotisch mit Chinolon oder Cephalosporinen der Gruppe 3a (69) und durch Gabe von Humanalbumin (75).

Zunehmende Antibiotikaresistenzen erschweren die effektive Therapie der SBP (77). Neue Behandlungsmöglichkeiten werden daher dringend gesucht.

4.2 Bakterielle Translokation über die destabilisierte intestinale Barriere

Die bakterielle Translokation wurde als der zugrundeliegende Mechanismus der SBP identifiziert (74,76,93). Bakterien gelangen durch Überwindung der Darmbarriere in die mesenterialen Lymphknoten und lösen eine Aktivierung des Immunsystems aus, was über die SBP hinaus zu einer Vielzahl von Komplikationen der Leberzirrhose wie portaler Hypertension, hepatorenalem Syndrom und hepatischer Enzephalopathie führen kann (93).

Die intestinale Barriere wird gebildet aus der zweischichtigen Mukusschicht (27,94), die die Bakterien bereits räumlich vom Darmepithel trennen. Auch antimikrobielle Peptide und sekretorisches IgA, das von dendritischen Zellen sezerniert wird, sollen dem Eindringen von Bakterien entgegenwirken (27). Viele Bakterienstämme haben jedoch Gegenmechanismen entwickelt und können beispielsweise Oligosaccharide der Mukusschicht degradieren (94). Wir konnten bereits zeigen, dass Darmbiopsien von Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine gerin-

gere Mukusschichtdicke aufweisen (81). Dadurch wird die räumliche Distanz der Bakterien zum Darmepithel verringert und eine Translokation ermöglicht. Für diesen Teil der intestinalen Barriere stellt unser bereits etabliertes *in vitro* Modell der Caco-2-Zellen (81,82) mit seiner Ähnlichkeit zur humanen Epithelzellschicht des Darmes ein gutes Abbild dar.

Neben der Mukusschicht des Darmes sind Zell-Zell-Kontakte wie Desmosomen, *tight-junctions* und *adherens-junctions* (95) essentiell für die Stabilität der intestinalen Barriere. Assimakopoulos et al. wiesen immunhistochemisch eine Reduktion von Occludin in Gewebsschnitten von Patienten mit Leberzirrhose nach (78). Dabei fand sich insbesondere bei dekompensierter Leberzirrhose eine deutlich verminderte Expression dieses *tight-junction* Proteins (78). Übereinstimmend damit zeigen Daten unserer Arbeitsgruppe, dass die Zell-Zell-Kontakt-Proteine E-Cadherin und Occludin im Darmepithel von Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne SBP in deutlich geringerer Menge vorhanden sind (81). In einem von uns entwickelten *in vitro* Ko-Kultur Modell aus Caco-2-Zellen und Bakterien konnten wir zudem aufzeigen, dass Bakterien nach direktem Kontakt mit Epithelzellen aktiv die Degradation dieser beiden Proteine induzieren (81). Der Abbau von Occludin findet dabei über das zelluläre Proteasom statt, das durch den Kontakt mit Bakterien aktiviert wird. Dieser Mechanismus konnte für die Degradation von E-Cadherin jedoch ausgeschlossen werden (81). Wir haben daher den Mechanismus der Reduktion / des Abbaus von E-Cadherin in dieser Dissertation weiter untersucht.

Die Reduktion beider Zell-Zell-Kontakt-Proteine ließ sich auch im Rahmen dieser Doktorarbeit auf Proteinebene mittels Western Blot nach Ko-Kultur mit verschiedenen Bakterienstämmen darstellen und bestätigen. Dabei zeigte sich, dass das Ausmaß der Reduktion von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen Bakterienstamm-spezifische Unterschiede aufweist.

4.3 Degradation von E-Cadherin durch eine bisher unbekannte bakterielle Proteaseaktivität mit Folge der Destabilisierung der epithelialen Integrität

Schon lange stehen verschiedene bakterielle Proteasen unterschiedlicher Bakterien im Fokus der Forschung, die sich mit der Pathogenität von Bakterien beschäftigt (88,96,97).

P. mirabilis gehört zu den Enterobakteriae, ist Gram-negativ und stellt mit anderen Genomospezies von *Proteus* einen kleinen Teil der natürlichen Darmflora dar (88).

Eine große Rolle bei der Pathogenität von *P. mirabilis* spielt seine Fähigkeit zur Ausbildung einer Vielzahl verschiedener Typen von Fimbrien, welche unter anderem eine Rolle bei der Ausbildung von Biofilmen und der Zelladhäsion spielen (88,98,99). Auch wurde eine Reihe an unterschiedlichen Proteasen gefunden, die Gelatin und teilweise auch Casein degradieren können (100). Dies konnten wir für Gelatin auch an dem von uns verwendeten – aus dem Aszites eines Patienten mit SBP isolierten – Stamm von *P. mirabilis* demonstrieren. Ein Fokus der Forschung liegt hierbei auf der Matrixmetalloprotease ZapA (Mirabilysin), die Immunglobuline und antimikrobielle Peptide abbauen kann (52,89,101). ZapA wird verstärkt beim charakteristischen Schwärmen von *P. mirabilis* ausgeschüttet. Dieser Vorgang kann sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen auftreten und es ist nicht ausgeschlossen, dass es auch *in vivo* im Darm so dazu kommen kann, dass sich das Bakterium ausbreitet (88). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass *P. mirabilis* unter bestimmten Bedingungen durch die Mukusschicht zum Darmepithel gelangen kann (88). Die Tatsache, dass *P. mirabilis* häufig Antibiotikaresistenzen aufweist (88) kann die Behandlung der betroffenen Patienten zusätzlich erschweren, auch wenn es nur in einer Minderheit der Fälle von SBP nachgewiesen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das SBP-Isolat von *P. mirabilis* als auch weitere SBP-Isolate von *E. coli* im Ko-Kultur-Modell mit Caco-2-Zellen zu einer signifikanten Reduktion von E-Cadherin und Occludin führen. Die aktive Induktion des Abbaus von Zell-Zell-Kontaktproteinen könnte einen Mechanismus darstellen, wie es Bakterien gelingt, das Darmepithel derart zu destabilisieren, dass es die Barriere durchbrechen und in den Aszites gelangen kann.

Bemerkenswert ist, dass *P. mirabilis* im Ko-Kultur-Modell zu erhöhten Zelltodraten führt, diese aber durch MMP-Inhibition nicht verringert werden. Die Blockade der bakteriellen Degradation von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen durch die MMP-Inhibitoren BB-2516 und MMP-8-Inhibitor I ist somit nicht auf veränderte Zelltodraten zurückzuführen, sondern kann der Interaktion der Inhibitoren mit der bislang unbekannten bakteriellen Protease zugeschrieben werden. Diese Hypothese wird dadurch bestätigt, dass die

Proteaseaktivität von *P. mirabilis* im Azocasein Assay in Abwesenheit von Epithelzellen deutlich nachweisbar war und durch MMP-Inhibitoren stark reduziert wurde. Der fehlende induktive Effekt SBP-induzierender Bakterien auf die zelluläre MMP-mRNA Expression deutet ebenfalls darauf hin, dass die MMP-Inhibition eine bakterielle Protease adressiert, die eine Gelatin-spaltende Qualität besitzt.

Zusammen mit den Vordaten unserer Arbeitsgruppe zeigt die vorliegende Arbeit, dass für die Degradation von E-Cadherin eine bisher unbekannte bakterielle Proteaseaktivität verantwortlich sein muss. Die höchste Proteaseaktivität wurde in dem aus Patienten isolierten SBP-Stamm *P. mirabilis* nachgewiesen. Übereinstimmend damit konnte auch in weiteren *E. coli*-Isolaten aus SBP-Aszites eine entsprechende Proteaseaktivität detektiert werden (81). Da diese Aktivität teilweise durch die MMP-Inhibitoren BB-2516, MMP-8 Inhibitor I und BB-94 (81) blockiert werden konnte, legen unsere Ergebnisse nahe, dass patientenabgeleitete *E. coli*-Stämme eine Protease exprimieren, die E-Cadherin gezielt abbaut. Ob es sich bei der betreffenden Protease um ZapA oder eine andere bislang unbekannte Protease handelt, ist bisher nicht bekannt und Gegenstand unserer aktuellen Untersuchungen.

Sowohl die destabilisierenden Effekte auf das Darmepithel als auch die Proteaseaktivität wurden bei dem *E. coli* Laborstamm O6:Hnt, aber insbesondere und in deutlich stärkerem Maß bei Isolaten aus dem Aszites von Patienten mit SBP beobachtet. Dies stützt unsere Hypothese, dass intestinale Bakterien Zell-Zell-Kontakt-Strukturen durch die Induktion proteolytischer Mechanismen aktiv destabilisieren können und zeigt deren klinische Relevanz.

Sumitomo et al. berichteten 2013 darüber, dass SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin B) aus Gruppe A-Streptokokken dazu in der Lage ist, direkt die Zell-Zell-Kontakte E-Cadherin und Occludin zu degradieren. Dies ermögliche den Durchtritt der Bakterien durch Haut und Pharynx und führe zu verschiedenen Erkrankungen wie Pharyngitis, nekrotisierender Faszitis und Streptokokken-Toxic-Shock-Syndrom (97). SpeB autokatalysiert zu einer Cystein-Protease, welche verschiedene Proteine degradieren kann. Dieser Vorgang kann durch unterschiedliche Cystein-Protease-Inhibitoren verhindert werden, MMP-Inhibitoren zeigten sich hier wirkungslos (97).

2011 zeigten Steck et al., dass die bakterielle Metalloprotease GelE von *Enterococcus faecalis* zur Reduktion der Integrität der epithelialen Barriere führen kann, indem sie

zur Reduktion insbesondere des extrazellulären E-Cadherin sowie von Occludin führt. Dies kann zu verstärkter Inflammation führen. Der MMP-Inhibitor BB-2516 (Marimastat) konnte die Proteaseaktivität von GeE signifikant reduzieren (96).

Auch *Candida albicans*, *Campylobacter jejuni* und *Bacteroides fragilis* können auf verschiedene Weise zur Degradierung von E-Cadherin beitragen und somit zur Destabilisierung der AJs führen (25).

Insgesamt stehen Zell-Zell-Kontakte daher im Fokus verschiedener Bakterien auf ihrem Weg in den menschlichen Körper und stellen ein mögliches therapeutisches Ziel in der Prävention und in der Behandlung betroffener Patienten dar.

4.4 Die Suche nach der Protease

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, dass SBP-induzierende Bakterien eine (oder mehrere) Protease(n) sezernieren, welche zur Degradation der Zell-Zell-Kontakte führt / führen. So konnten wir in unserem Filterversuch zeigen, dass bakterielle Metabolite mit einer Größe zwischen 0,22 und 0,45 µm bei der Ko-Kultur der Bakterien mit Caco-2-Zellen freigesetzt werden, welche dann eine Degradation von E-Cadherin und Occludin bewirken können. Die Tatsache, dass sich in den Azocasein Versuchen mit verschiedenen Bakterien ohne Zellkontakt eine Aktivität nachweisen ließ, welche sich durch Zugabe der MMP-Inhibitoren BB-2516 und MMP-8-Inhibitor I reduzieren ließ, spricht dafür, dass es sich bei der / den gesuchten Substanz(en) um eine oder mehrere bakterielle Protease(n) handelt. Ziel weiterer Forschung muss es nun sein, diese Protease(n) zu identifizieren, um sie für neue medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten greifbar zu machen. Dies könnte beispielsweise über die irreversible Bindung der MMP-Inhibitoren geschehen, über die die gesuchte Protease an den Inhibitoren haftet und so massenspektrometrisch identifiziert werden könnte.

4.5 Alternative Mechanismen für die Degradation von E-Cadherin

Zell-Zell-Kontakte stehen auch im Fokus der Forschung bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

So zeigten Wang et al. 2021, dass LPS aus Vesikeln der äußeren Membran (OMV) von *E. coli* BL21, welche in das intestinale Epithel gelangen können, eine Aktivierung von Caspase-5 und PIKfyve über den Kanal SNX10 auslösen mit nachfolgender Phosphorylierung von Lyn. Dadurch wird über eine nukleäre Lokalisierung von Snail und Slug eine deutliche Herabregulation von E-Cadherin bewirkt, die durch Inhibition von

SNX10 reduziert werden kann (102). Dieser Mechanismus kann für unser Modell ausgeschlossen werden, da zum einen die bakteriell-vermittelte Regulation von E-Cadherin im Ko-Kultur-Modell nicht über die Suppression der Genexpression erfolgt (81) und zum anderen die Zugabe von LPS zu Caco-2-Zellen nicht zu veränderten Proteinkonzentrationen von E-Cadherin und Occludin führte (81).

Vanaja et al. zeigten, dass sogenannte „outer membrane vesicles“ (OMVs) essentiell für die Aufnahme von LPS in die Zellen sind (103).

Da unsere Experimente mit LPS ohne OMVs durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass LPS dennoch eine essenzielle Rolle bei der von uns beobachteten Degradation der Zell-Zell-Kontakte spielt.

Ein Zusammenhang zwischen LPS und der Aktivierung von MMPs wurde bereits in anderen Studien untersucht. So wurde 2020 gezeigt, dass LPS MMP-12 in RSV-infizierten Lungen induziert, was zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz des MMP-Inhibitors MMP408 reduziert werden (104).

4.6 Proteaseinhibition als Therapiestrategie bei Leberzirrhose und SBP

Die Strategie zur Hemmung von Proteasen, ursprünglich für die Tumorthherapie etabliert, hat sich von unspezifischen Hemmstoffen hin zu zielgerichteten Inhibitoren entwickelt und findet mittlerweile auch Anwendung bei anderen Krankheitsbildern (105,106). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Inhibitoren bakterieller Proteasen als potenzielle Therapieansätze für SBP betrachtet werden sollten. Angesichts der zunehmenden Resistenzen und des Versagens aktueller Antibiotika bei Patienten mit Leberzirrhose und SBP, bieten bakterielle Proteasen ein neues Ziel für die Therapie. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte bislang unbekannte Proteaseaktivität stellt ein solches therapeutisches Ziel dar.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit anhand unseres Caco-2-Ko-Kultur-Modells, dass die direkte Interaktion von Darmepithelzellen und Bakterien zu einer Destabilisierung essenzieller Zell-Zell-Kontaktproteine führt (Abbildung 17). Die Ausprägung dieses Effekts ist abhängig vom individuellen Bakterienstamm. Für den Abbau von E-Cadherin sind dabei MMP-Inhibitor-sensitive bakterielle Proteasen verantwortlich. Von besonderer klinischer Relevanz ist dabei, dass diese Effekte auch – und dies in besonderem Maß – bei Bakterien beobachtet werden, die aus dem Aszites von Pa-

tienten mit SBP isoliert wurden. In Kombination mit weiteren Daten unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass bei Patienten mit Leberzirrhose und SBP die Dicke der kolorektalen Mukusschicht verringert ist und die *tight-* und *adherens-junction* Proteine E-Cadherin und Occludin herabreguliert werden (81), zeigt die vorliegende Arbeit einen neuen Aspekt des Pathomechanismus der SBP auf und mit der Inhibition der neu identifizierten bakteriellen Protease eine Möglichkeit der zielgerichteten Prävention und Therapie.

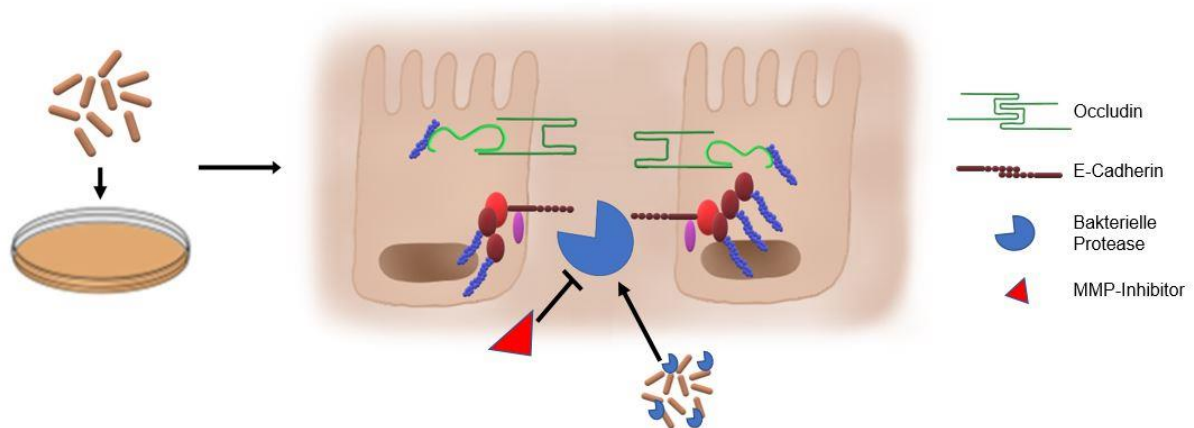


Abbildung 17: Destabilisierung der Zell-Zell-Kontaktpoteine E-Cadherin und Occludin durch direkte Interaktion von Bakterien mit Darmepithelzellen, im Fall von E-Cadherin durch eine MMP-sensitive Protease, welche durch MMP-Inhibitoren blockiert werden kann (vergleiche Abbildung 3).

5 Zusammenfassung

Die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) stellt mit einer hohen Mortalität eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose dar (107). Eine Rolle bei der Pathogenese der SBP spielt die bakterielle Translokation (BT), durch die Bakterien aus dem Darm-lumen in die systemische Zirkulation gelangen (79). Dies wird bei Gesunden durch eine intakte intestinale Barriere bestehend aus der Mukusschicht, der epithelialen Barriere sowie der Darm-Gefäß-Barriere verhindert (28). Bei Patienten mit Leberzirrhose ist die intestinale Barriere jedoch gestört, sodass eine BT verstärkt möglich ist (81). Neue medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten der SBP sind daher erforderlich.

In dieser Arbeit wurden die bakteriellen Effekte auf die Zell-Zell-Kontakte E-Cadherin und Occludin im Darmepithel untersucht. Hierzu wurden Bakterienstämme, die aus dem Aszites von Patienten mit Leberzirrhose und SBP isoliert wurden, in einem *in vitro* Ko-Kultur-Modell mit Caco-2-Zellen eingesetzt. Zur Charakterisierung degradierender Mechanismen wurden Inhibitoren von Matrixmetalloproteasen (MMP) verwendet.

Die Ko-Kultur von Caco-2-Zellen mit einem *E. coli* Laborstamm sowie Isolaten von *E. coli* und *P. mirabilis* aus SBP-Aszites führten zu einer signifikanten Degradation der Zell-Zell-Kontaktproteine E-Cadherin und Occludin. Die Reduktion dieser Proteine erfolgte dabei überwiegend auf Protein-Ebene. Für den Abbau von E-Cadherin ist eine bisher unbekannte bakterielle Proteaseaktivität verantwortlich. Diese Proteaseaktivität war sensitiv gegenüber den MMP-Inhibitoren BB-2516 und MMP-8-Inhibitor I, welche zum einen die reine Proteaseaktivität der Bakterien reduzierten und zum anderen der Destabilisierung von E-Cadherin entgegenwirkten.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass SBP-relevante Bakterien aus SBP-Aszites zu einer Degradation der Zell-Zell-Kontakte E-Cadherin und Occludin im Darmepithel führen, was die Barrierefunktion destabilisiert. Die Degradation von E-Cadherin erfolgt durch bakterielle Proteasen, die durch MMP-Inhibitoren blockiert werden können, was die Stabilität der Zell-Zell-Kontakte wiederherstellt. Diese Ergebnisse bieten einen Ansatz für neue therapeutische Strategien zur Prävention und Behandlung der SBP.

6 Abkürzungsverzeichnis

AJ	<i>Adherence-junction</i>
BT	Bakterielle Translokation
Bzw.	beziehungsweise
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
Et al.	Und andere (<i>et alia</i>)
EZM	Extrazelluläre Matrix
GVB	Darm-Gefäß-Barriere
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
LPS	Lipopolysaccharid
MASH	Metabolische Dysfunktion-assoziierte Steatohepatitis (<i>metabolic dysfunction-associated steatohepatitis</i>)
MASLD	Metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung (<i>metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease</i>)
MMP	Matrixmetalloprotease
MOI	Multiziplität der Infektion
OD	Optische Dichte
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
qPCR	Qualitative Polymerasekettenreaktion
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
TIMP	Gewebeinhibitor von Metalloproteasen (<i>tissue inhibi- tor of matrix metalloproteinases</i>)
TJ	<i>Tight-junction</i>
TLR	Toll-Like-Rezeptor

7 Anhang

Tabelle 11: Antibiotogramm der verwendeten Bakterienstämme

Antibiotikum	<i>E. coli</i> O6:Hnt	<i>E. coli</i> Ont:H41	<i>E. coli</i> O18:H7	<i>E. coli</i> Ont:Hnt	<i>P. mirabilis</i>
Ampicillin o. Amoxicillin	H	H	S	S	H
Amoxicillin / Clavulansäure	H	H	S	S	H
Piperacillin		S			S
Piperacillin / Tazobactam		S	S	S	S
Cefuroxim i.v.	H	H	S	S	H
Ceftriaxon o. Cefotaxim		S	S	S	S
Ceftazidim		S	S	S	S
Cefepim		S	S	S	S
Cefoxitin		X	S	S	
Imipenem		S	S	S	
Meropenem		S	S	S	S
Ertapenem		S	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	S
Levofloxacin		S	S	S	S
Cotrimoxazol	S	S	S	S	S
Gentamicin		S	S	S	S
Amikacin		S	S	S	S
Tobramycin		S			S
Tigecyclin		S		S	R
Nitrofurantoin		S	S	S	
Colistin					R
Fosfomycin		S			S
Pivmecillinam		S			
Trimethoprim		S			R
Aztreonam		S	S	S	S
Tigarcillin / Clavulansäure		S			S

8 Literatur

1. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Current Biology*. November 2017;27(21):R1147–51.
2. Silbernagl S, Lang F. Taschenatlas der Pathophysiologie. 2. korrigierte Auflage. New York, NY: Thieme; 2005.
3. Tannapfel A, Klöppel G, Herausgeber. Pathologie: Leber, Gallenwege und Pankreas [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020 [zitiert 26. Februar 2024]. (Pathologie). Verfügbar unter: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-04557-8>
4. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*. März 2020;72(3):558–77.
5. Schmid S, Scherm S, Haderer M, Gülow K, Müller-Schilling M. Infektionen bei Leberzirrhose – von bakterieller Translokation über spontan-bakterielle Peritonitis und Pneumonie zum akut-auf-chronischen Leberversagen. *Gastroenterologe*. Mai 2020;15(3):201–10.
6. Wilde B, Katsounas A. Immune Dysfunction and Albumin-Related Immunity in Liver Cirrhosis. *Mediators of Inflammation*. 25. Februar 2019;2019:1–9.
7. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *The Lancet*. Mai 2014;383(9930):1749–61.
8. Armando T, Mannuccio MP. The Coagulopathy of Chronic Liver Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2011;
9. Wijdicks EFM. Hepatic Encephalopathy. Longo DL, Herausgeber. *N Engl J Med*. 27. Oktober 2016;375(17):1660–70.
10. Shenoda B, Boselli J. Vascular syndromes in liver cirrhosis. *Clin J Gastroenterol*. Oktober 2019;12(5):387–97.
11. Tayyem O, Bilal M, Samuel R, Merwat SK. Evaluation and management of variceal bleeding. *Disease-a-Month*. Juli 2018;64(7):312–20.

12. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology*. Januar 2006;44(1):217–31.
13. Arroyo V, Moreau R, Kamath PS, Jalan R, Ginès P, Nevens F, u. a. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis. *Nat Rev Dis Primers*. 9. Juni 2016;2(1):16041.
14. Li B, Zhang C, Zhan YT. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Cirrhosis: A Review of Its Epidemiology, Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis, Management, and Prognosis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2. Juli 2018;2018:1–8.
15. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*. Januar 2019;70(1):151–71.
16. Zhou WC. Pathogenesis of liver cirrhosis. *WJG*. 2014;20(23):7312.
17. Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. From NAFLD to NASH to cirrhosis—new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. November 2013;10(11):627–36.
18. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*. März 2013;58(3):593–608.
19. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. Oktober 2014;14(10):667–85.
20. Gasbarrini G, Montalto M, Santoro L, Curigliano V, D'Onofrio F, Gallo A, u. a. Intestine: Organ or Apparatus? *Dig Dis*. 2008;26(2):92–5.
21. Anatomie. 3., aktualisierte Auflage. Thieme; 2014. (Duale Reihe).
22. Kühnel, W. Taschenatlas Histologie. 13., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2014.
23. Yu LCH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *WJGP*. 2012;3(1):27.

24. Shawki A, McCole DF. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive Escherichia coli. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. Januar 2017;3(1):41–50.
25. Daulagala AC, Bridges MC, Kourtidis A. E-cadherin Beyond Structure: A Signaling Hub in Colon Homeostasis and Disease. *IJMS*. 5. Juni 2019;20(11):2756.
26. Burgueño JF, Abreu MT. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Mai 2020;17(5):263–78.
27. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. März 2010;10(3):159–69.
28. Brescia P, Rescigno M. The gut vascular barrier: a new player in the gut–liver–brain axis. *Trends in Molecular Medicine*. September 2021;27(9):844–55.
29. Ponziani FR, Zocco MA, Cerrito L, Gasbarrini A, Pompili M. Bacterial translocation in patients with liver cirrhosis: physiology, clinical consequences, and practical implications. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 3. Juli 2018;12(7):641–56.
30. Maier E, Anderson R, Roy N. Understanding How Commensal Obligate Anaerobic Bacteria Regulate Immune Functions in the Large Intestine. *Nutrients*. 24. Dezember 2014;7(1):45–73.
31. Spencer, J; Ragout de Spencer, A. *Public Health Microbiology. Methods and Protocols*. Humana Totowa, NJ; 2004.
32. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*. Februar 2010;10(2):131–44.
33. Kunst C, Schmid S, Michalski M, Tümen D, Buttenschön J, Müller M, u. a. The Influence of Gut Microbiota on Oxidative Stress and the Immune System. *Biomedicines*. 8. Mai 2023;11(5):1388.
34. Gómez-Hurtado I. Gut microbiota-related complications in cirrhosis. *WJG*. 2014;20(42):15624.
35. Bhat M, Arendt BM, Bhat V, Renner EL, Humar A, Allard JP. Implication of the intestinal microbiome in complications of cirrhosis. *WJH*. 2016;8(27):1128.

36. Arab JP, Martin-Mateos RM, Shah VH. Gut–liver axis, cirrhosis and portal hypertension: the chicken and the egg. *Hepatol Int.* Februar 2018;12(S1):24–33.
37. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V. Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *Journal of Hepatology.* November 2015;63(5):1272–84.
38. Milosevic I, Vujovic A, Barac A, Djelic M, Korac M, Radovanovic Spurnic A, u. a. Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *IJMS.* 17. Januar 2019;20(2):395.
39. Page MJ, Kell DB, Pretorius E. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress.* Januar 2022;6:247054702210763.
40. Giannelli V. Microbiota and the gut-liver axis: Bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. *WJG.* 2014;20(45):16795.
41. Van Spaendonk H, Ceuleers H, Witters L, Patteet E, Joossens J, Augustyns K, u. a. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *WJG.* 2017;23(12):2106.
42. Simbrunner B, Mandorfer M, Trauner M, Reiberger T. Gut-liver axis signaling in portal hypertension. *WJG.* 21. Oktober 2019;25(39):5897–917.
43. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* November 2009;9(11):799–809.
44. Buckley A, Turner JR. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Januar 2018;10(1):a029314.
45. Usuda H, Okamoto T, Wada K. Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. *IJMS.* 16. Juli 2021;22(14):7613.
46. Cummins PM. Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol Cell Biol.* 15. Januar 2012;32(2):242–50.
47. Feldman G, Mullin J, Ryan M. Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 25. April 2005;57(6):883–917.
48. Runkle EA, Mu D. Tight junction proteins: From barrier to tumorigenesis. *Cancer Letters.* August 2013;337(1):41–8.

49. Cronin NM, DeMali KA. Dynamics of the Actin Cytoskeleton at Adhesion Complexes. *Biology*. 30. Dezember 2021;11(1):52.
50. Troyanovsky SM. Adherens junction: the ensemble of specialized cadherin clusters. *Trends in Cell Biology*. Mai 2023;33(5):374–87.
51. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2017 [zitiert 7. Februar 2023]. S. 1–73. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117317300327>
52. Veerle Noë, Barbara Fingleton, Kathleen Jacobs. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *Journal of Cell Science*. 11. Dezember 2000;(114):111–8.
53. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2007;8(3):221–33.
54. Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Januar 2010;1803(1):39–54.
55. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases: Extracellular matrix remodelling. *J Pathol*. Juli 2003;200(4):448–64.
56. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 15. Februar 2006;69(3):562–73.
57. Jabłońska-Trypuć, A, Matejczyk, M, Rosochacki, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30. März 2016;(31:sup1):177–83.
58. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1. Juni 2018;17(6):1147–55.

59. Whittaker M, Floyd CD, Brown P, Gearing AJH. Design and Therapeutic Application of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Chem Rev.* 8. September 1999;99(9):2735–76.
60. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New Drugs.* 1997;(15):61–75.
61. Fisher JF, Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev.* März 2006;25(1):115–36.
62. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5362422, Batimastat. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Batimastat>. Accessed Feb. 8, 2023. 2023.
63. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 119031, Marimastat. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Marimastat>. Accessed Feb. 8, 2023. 2023.
64. Dufour A, Overall CM. Missing the target: matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences.* April 2013;34(4):233–42.
65. <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/s1326>. 2023.
66. MMP-8 Inhibitor I - CAS 236403-25-1 - Calbiochem <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/mm/444237?msockid=00dfe03195c76f6a03bbf63294206ee4>. 2023.
67. Marciano S, Díaz JM, Dirchwolf M, Gadano A. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis: incidence, outcomes, and treatment strategies. *HMER.* Januar 2019;Volume 11:13–22.
68. Tay PWL, Xiao J, Tan DJH, Ng C, Lye YN, Lim WH, u. a. An Epidemiological Meta-Analysis on the Worldwide Prevalence, Resistance, and Outcomes of Spontaneous Bacterial Peritonitis in Cirrhosis. *Front Med.* 5. August 2021;8:693652.
69. A. L. Gerbes, V. Gülberg, T. Sauerbruch, R. Wiest, B. Appenrodt, M. J. Bahr, M. M. Dollinger, M. Rössle, M. Schepke. S3-Leitlinie „Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom“. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York; 2011.

70. Mattos AA, Wiltgen D, Jotz RF, Dornelles CMR, Fernandes MV, Mattos ÂZ. Spontaneous bacterial peritonitis and extraperitoneal infections in patients with cirrhosis. *Annals of Hepatology*. September 2020;19(5):451–7.
71. Schwabl P, Bucsics T, Soucek K, Mandorfer M, Bota S, Blacky A, u. a. Risk factors for development of spontaneous bacterial peritonitis and subsequent mortality in cirrhotic patients with ascites. *Liver Int*. September 2015;35(9):2121–8.
72. Fernández J, Acevedo J, Wiest R, Gustot T, Amoros A, Deulofeu C, u. a. Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut*. Oktober 2018;67(10):1870–80.
73. Piano S, Singh V, Caraceni P, Maiwall R, Alessandria C, Fernandez J, u. a. Epidemiology and Effects of Bacterial Infections in Patients With Cirrhosis Worldwide. *Gastroenterology*. April 2019;156(5):1368-1380.e10.
74. Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. April 2004;18(2):353–72.
75. Dever JB, Sheikh MY. Review article: spontaneous bacterial peritonitis - bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Aliment Pharmacol Ther*. Juni 2015;41(11):1116–31.
76. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Arnal J, Coll P, u. a. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *Journal of Hepatology*. 1998;(28):307–13.
77. Alexopoulou A, Vasilieva L, Agiasotelli D, Siranidi K, Pouriki S, Tsiriga A, u. a. Extensively drug-resistant bacteria are an independent predictive factor of mortality in 130 patients with spontaneous bacterial peritonitis or spontaneous bacteremia. *WJG*. 2016;22(15):4049.
78. Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, u. a. Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability: INTESTINAL TIGHT JUNCTIONS IN CIRRHOSIS. *European Journal of Clinical Investigation*. April 2012;42(4):439–46.

79. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology*. Januar 2014;60(1):197–209.
80. Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, Paolinelli R, Hot E, Di Sabatino A, u. a. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science*. 13. November 2015;350(6262):830–4.
81. Haderer M, Neubert P, Rinner E, Scholtis A, Broncy L, Gschwendtner H, u. a. Novel pathomechanism for spontaneous bacterial peritonitis: disruption of cell junctions by cellular and bacterial proteases. *Gut*. März 2022;71(3):580–92.
82. Haderer M. Spontan bakterielle Peritonitis - Mechanismen der Pathogenese. Eine neue Funktion der p53 Familie in der bakteriellen Abwehr. [Regensburg]; 2019.
83. Engle MJ, Goetz GS, Alpers DH. Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol*. März 1998;174(3):362–9.
84. Devriese S, Van den Bossche L, Van Welden S, Holvoet T, Pinheiro I, Hindryckx P, u. a. T84 monolayers are superior to Caco-2 as a model system of colonocytes. *Histochem Cell Biol*. Juli 2017;148(1):85–93.
85. Hu X, Beeton C. Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *JoVE*. 8. November 2010;(45):2445.
86. Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide by T Cell Receptor Stimulation: Selective Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Fas Ligand Expression.
87. Kamiński M, Kießling M, Süss D, Krammer PH, Gülow K. Novel Role for Mitochondria: Protein Kinase C θ -Dependent Oxidative Signaling Organelles in Activation-Induced T-Cell Death. *Mol Cell Biol*. 15. Mai 2007;27(10):3625–39.
88. Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC, Morrison M. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. Juli 2018;31(3):e00085-17.
89. Belas R, Manos J, Suvanasuthi R. *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates, Including Antimicrobial Peptides. *Infect Immun*. September 2004;72(9):5159–67.

90. Long B, Gottlieb M. Emergency medicine updates: Spontaneous bacterial peritonitis. *The American Journal of Emergency Medicine*. August 2023;70:84–9.
91. Abdel-Samiee M. Prognosis of spontaneous bacterial peritonitis in patients with hepatocellular carcinoma. *THE AMERICAN JOURNAL OF THE MEDICAL SCIENCES*. 2023;367(3).
92. Numan L, Elkafrawy A, Kaddourah O, Brotherton T, Saeed L, Zafar Y, u. a. Spontaneous Bacterial Peritonitis: We Are Still Behind. *Cureus* [Internet]. 17. April 2020 [zitiert 7. Februar 2023]; Verfügbar unter: <https://www.cureus.com/articles/30473-spontaneous-bacterial-peritonitis-we-are-still-behind>
93. Bellot P, Francés R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*. Januar 2013;33(1):31–9.
94. Sicard JF, Le Bihan G, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol*. 5. September 2017;7:387.
95. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 1. Januar 2010;5(1):119–44.
96. Steck N, Hoffmann M, Sava IG, Kim SC, Hahne H, Tonkonogy SL, u. a. *Enterococcus faecalis* Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*. September 2011;141(3):959–71.
97. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, Kawabata S. Group A Streptococcal Cysteine Protease Cleaves Epithelial Junctions and Contributes to Bacterial Translocation. *Journal of Biological Chemistry*. Mai 2013;288(19):13317–24.
98. Armbruster CE, Mobley HLT. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol*. November 2012;10(11):743–54.
99. Rocha SPD, Pelayo JS, Elias WP. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Oktober 2007;51(1):1–7.
100. Senior BW. Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *Proteus* species. *Journal of Medical Microbiology*. 1. Juli 1999;48(7):623–8.

101. Carson L, Cathcart GR, Scott CJ, Hollenberg MD, Walker B, Ceri H, u. a. Comprehensive inhibitor profiling of the *Proteus mirabilis* metalloprotease virulence factor ZapA (mirabilysin). *Biochimie*. Oktober 2011;93(10):1824–7.
102. Wang X, Ni J, You Y, Feng G, Zhang S, Bao W, u. a. SNX10-mediated LPS sensing causes intestinal barrier dysfunction via a caspase-5-dependent signaling cascade. *The EMBO Journal*. 15. Dezember 2021;40(24):e108080.
103. Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, u. a. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell*. Mai 2016;165(5):1106–19.
104. Chen S, Xie J, Zhao K, Ren L, Deng Y, Xie X, u. a. LPS aggravates lung inflammation induced by RSV by promoting the ERK-MMP-12 signaling pathway in mice. *Respir Res*. Dezember 2020;21(1):193.
105. Vergnolle N. Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. *Gut*. Juli 2016;65(7):1215–24.
106. Caminero A, Guzman M, Libertucci J, Lomax AE. The emerging roles of bacterial proteases in intestinal diseases. *Gut Microbes*. 31. Dezember 2023;15(1):2181922.
107. Van Erpecum KJ. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Januar 2006;41(sup243):79–84.

9 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Eva Lampe, geb. Rinner, geboren am 29.12.1996 in Regensburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungsbeziehungsweise Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bedanken bei allen, die mich unterstützt haben in der Entstehung dieser Doktorarbeit.

Vielen Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Müller-Schilling für die Aufnahme in ihr Laborteam. Herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Kunst und Herr PD Dr. Gülow für die wunderbare Betreuung im Rahmen der Experimente. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Haderer und Frau Gschwendtner bedanken für die liebevolle Einarbeitung und stetige Beantwortung aller Fragen rund um alles, was mit Labor zu tun hat. Liebe Marika, liebe Heidi, ohne Euch wäre das hier nicht möglich gewesen. Danke auch an alle anderen im Labor, die die gemeinsame Zeit unvergesslich gemacht haben.

Vielen Dank auch an meine Freunde und Familie, die mich motiviert haben dabei zu bleiben, gerade wenn es einmal nicht gut vorangegangen ist; liebe Sofiia, insbesondere Dir ein herzliches Dankeschön. Für die Motivierung in den letzten Zügen dieser Arbeit möchte ich auch meiner Mutter und meinem Mann Leo danken, ohne euch wäre es vermutlich immer „fast fertig“ gewesen.